

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen**

**Abteilung Physiologie I**

**Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang**

**„Wirkung des von *Vibrio parahaemolyticus* produzierten  
Hämolysin Kanagawa (TDH) auf menschliche Erythrozyten“**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stefanie Kaiser  
aus  
Biberach a.d. Riß**

**2007**

Dekan: Herr Professor Dr. I.B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Herr Professor Dr. F. Lang  
2. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher



## I. Inhaltsverzeichnis

<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Vibrio parahaemolyticus	1
1.2	Hämolyse Kanagawa und das Kanagawa Phänomen	3
1.3	Apoptose bei kernhaltigen Zellen	4
1.3.1	Physiologische Bedeutung der Apoptose	4
1.3.2	Todesrezeptoren - Angehörige der TNF-Rezeptor-Superfamilie	7
1.3.3	Rezeptor-vermittelte Signalwege in der Apoptose	8
1.3.4	Caspasen und Apoptose	11
1.3.5	Mitochondrien-vermittelte Apoptose	13
1.3.6	Sphingomyelin-vermittelte Apoptose	14
1.4	Apoptose bei kernlosen Zellen: Erythrozyten	16
1.4.1	Voraussetzungen für Apoptose bei Erythrozyten	16
1.4.2	Membranpotential bei Erythrozyten	16
1.4.3	Unspezifische Kationkanäle	19
1.4.4	Ein Ca <sup>2+</sup> -abhängiger K <sup>+</sup> -Kanal: der Gardos-Kanal	20
1.4.5	Die Scramblase und der Phosphatidylserin-Flip-Flop	23
1.4.6	Elimination apoptotischer Zellen durch Makrophagen	26
1.5	Fragestellung der Arbeit	28
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Verwendete Lösungen und Substanzen	29
2.1.1	Standard-Ringer-Lösung	29
2.1.2	Kalziumfreie Lösung (EGTA)	30
2.1.3	125 mM Kalium-Ringer-Lösung	30
2.1.4	29 mM Kalium-Ringer-Lösung	31

## I. Inhaltsverzeichnis

---

2.1.5	Natriumfreie NMDG-Cl-Lösung	32
2.1.6	Annexin-Waschpuffer	32
2.1.7	Transfusionslösung	33
2.1.8	KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung	33
2.1.9	NaCl-Standardspüllösung	34
2.1.10	Natriumfreie NMDG-Cl-Spüllösung	34
2.1.11	Kalziumfreie EGTA-Spüllösung	35
2.1.12	Hochkalziumhaltige CaCl <sub>2</sub> -Spüllösung	35
2.2	Weitere Substanzen und deren Hersteller	36
2.3	Sonstige Verbrauchsgüter	37
2.4	Versuchsansätze und Zellsuspensionen	38
2.5	Annexin-Färbung mit Annexin-V-Fluos	38
2.6	Durchflusszytometrie	40
2.7	K <sup>+</sup> -Verlust bestimmt durch Flammenemissionsphotometrie	43
2.8	Bestimmung der Hämolyse mittels photometrischer Hb-Messung	44
2.8.1	Hämoglobin	44
2.8.2	Absorptionsphotometrie	46
2.9	Patch-clamp	47
2.10	Auswertung und Statistik	50
<b>3.</b>	<b>Versuche und Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Zellvolumenmessungen anhand der forward scatter	
	Bestimmung am FACS-Gerät	51
3.1.1	Durch Hämolysin Kanagawa induzierte Schrumpfung der Erythrozyten, gemessen mittels des Durchflusszytometers	51
3.1.2	Auswirkungen eines extrazellulären Natriumersatzes durch das hochmolekulare Kation NMDG <sup>+</sup> auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolysinexposition	57
3.1.3	Auswirkungen verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolysinexposition	59
3.1.4	Auswirkungen der Zugabe von 5 µM des Gardos-Kanal-	

## I. Inhaltsverzeichnis

---

	Blockers Clotrimazol zur Standard-Ringer-Lösung auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolysinexposition	61
3.2	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels der Annexin-V-Färbung und Messung über FL1 am FACS	64
3.2.1	Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran nach Hämolysinexposition	64
3.2.2	Auswirkungen eines extrazellulären Natriumersatzes durch das hochmolekulare Kation NMDG <sup>+</sup> auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran nach Hämolysinexposition	68
3.2.3	Auswirkungen verschiedener extrazellulärer Kalium- konzentrationen auf den Verlust der Phosphatidylserin- asymmetrie der erythrozytären Zellmembran nach Hämolysinexposition	70
3.2.4	Auswirkungen der Zugabe von 5µM des Gardos-Kanal- Blockers Clotrimazol zur Standard-Ringer-Lösung auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Plasmamembran nach Hämolysinexposition	72
3.3	Flammenemissionsphotometrisch bestimmte Kalium-Freisetzung	75
3.3.1	Kalium-Freisetzung nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen Hämolysin Kanagawa und Zugabe des Gardos- Kanal-Blockers Clotrimazol, gemessen mittels der Flammen- Emissionsphotometrie	75
3.4	Photometrische Messung des Anteils hämolytischer Erythrozyten	78
3.4.1	Messung der Hämolyse bei Erythrozyten, die mit niedrigen Konzentrationen des Hämolysins Kanagawa behandelt wurden	78
3.5	Bestimmung der Ströme über die Erythrozytenmembran mittels des Patch-Clamp Verfahrens	79
3.5.1	Durch das Hämolysin Kanagawa induzierte, nichtselektive, Kationströme in menschlichen Erythrozyten, gemessen in der whole-cell Konfiguration	79

3.5.2	Durch das Hämolysin Kanagawa induzierte Aktivierung des Gardos-Kanals	81
<b>4.</b>	<b>Interpretation und Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	Auswirkungen der Hämolysinexposition auf menschliche Erythrozyten	88
4.1.1	Aktivierung eines Kationkanals	88
4.1.2	Aktivierung des Gardos-Kanals	90
4.1.3	Aktivierung der Scramblase und der Phosphatidylserin-Flip-Flop in Zusammenhang mit einer Apoptoseinduktion durch das Hämolysin Kanagawa	91
4.1.4	Möglichkeiten, modulatorisch Einfluss auf die, durch Hämolysin Kanagawa induzierte, Apoptose zu nehmen	94
4.2	Sepsis – Anämie – Erythrozytenapoptose	96
4.2.1	Sepsis	96
4.2.2	Anämie, möglicherweise bedingt durch Apoptoseinduktion der zirkulierenden Bakterientoxine	98
4.2.3	Vorteile der Erythrozytenapoptose gegenüber der Hämolyse	98
4.3	Rolle der Apoptose im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder und modulatorische Eingriffsmöglichkeiten	99
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>128</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>129</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
APO-1	apoptosis antigen-1
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BK	large conductance
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
c	Konzentration eines Stoffes
$c_{i/a}$	Konzentration eines Ions innerhalb/außerhalb der Zelle
Ca	Kalziumatom
$Ca^{2+}$	Kalziumion
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
$Ca(OH)_2$	Kaliumhydroxid
CAD	caspase activated DNase
CAP	Ceramid-aktivierte-Proteinkinase
CARD	caspase recruitment domain, Caspase-Rekrutierungsdomäne
CD	cluster of differentiation
$Cl^-$	Chloridion
Clz	Clotrimazol
$Co^+$	Kobaltion
$Cs^+$	Cäsiumion
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
Daxx	Fas death domain-associated protein
DD	death domain, Todesdomäne

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

DED	death effector domain, Todeseffektordomäne
DIC	disseminated intravascular coagulation
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure
DISC	death inducing signaling complex, Todessignalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor
E	Extinktion
e	Extinktionskoeffizient
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure
EIPA	N-Ethyl-Isopropyl-Amilorid
F	Faraday-Konstante [ $10^5$ Cb/mol]
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associating protein with death domain
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
g	Gramm
Gl	Gleichung
G $\Omega$	Gigaohm
H	Wasserstoff
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HbA	adultes Hämoglobin
HbCn	Cyanhämoglobin
HbF	fetales Hämoglobin
HbO <sub>2</sub>	oxygeniertes Hämoglobin
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
I	Strom [Ampère]
I <sub>e/a</sub>	Intensität des eintretenden/austretenden Lichts

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

IK	intermediate conductance
IL	Interleukin
JNK	C-Jun N-terminal kinase, Angehörige der MAP-Kinasen
K	Kaliumatom
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KCN	Kaliumzyanid
kDa	Kilodalton
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Kaliumferrizyanid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LARD	lymphocyte associated receptor of death
lg	Logarithmus
Li	Lithiumatom
Li <sup>+</sup>	Lithiumion
ln	natürlicher Logarithmus
LT	Lymphotoxin
MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Met-Hb	Methämoglobin
Mg	Magnesiumatom
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
N	Stickstoff
n	Anzahl voneinander unabhängiger Versuchsdurchführungen
Na	Natriumatom
Na <sup>+</sup>	Natriumion

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	nerve growth factor
NH <sub>4</sub>	Ammonium
nm	Nanometer
NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
NO	Stickstoffmonoxid
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) Benzoessäure
O	Sauerstoff
P	Phosphor
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
P <sub>0</sub>	mittlere Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals
p	Gleichgewichtspotential für ein Ion [V]
pA	Pikoampere
PC	Phosphorylcholin
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PE	R-Phycoerythrin
PE-Cy5	R-Phycoerythrin-Cyanin-5
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii (lat. Pondus = Gewicht, hydrogenium = Wasserstoff)
PMT	photomultiplier tube
R	Gaskonstante [8,3 J/(K*mol)]
Raf-1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain
Rb	Rubidium
Rb <sup>+</sup>	Rubidiumion
RIP	Receptor interacting protein
SAPK	stress activated protein kinase
SE	standard error
SEM	standard error of the mean

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SK	small conductance
SM	Sphingomyelin
s.o.	siehe oben
SSC	side scatter
T	absolute Temperatur [K]
Tab	Tabelle
<i>t</i> -BHP	<i>t</i> -Butylhydroperoxid
Tab	Tabelle
TDH	thermostable direct hemolysin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TRADD	TNF-RSF1A-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAMP	TNF receptor-related apoptosis-mediating protein
TRH	toxin related hemolysin
U	Spannung [Volt]
U/ml	Units pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Vibrio
VAC alpha	vascular anticoagulant alpha
x	Anzahl aktiver Kanäle
$z_i$	Ladung eines diffundierenden Teilchens
$\Omega$	Widerstand [Ohm]
%	Prozent

# 1 Einleitung

## 1.1 *Vibrio parahaemolyticus*

1786 versuchte der aus Kopenhagen stammende Arzt Otho Friedrich Müller eine Bakteriensystematik mit wissenschaftlicher Nomenklatur zu schaffen. Er beschrieb Mikroben, die er aufgrund ihrer Beweglichkeit als Zittertierchen oder als Vibrionen<sup>1</sup> bezeichnete [Hof und Dörries, 2000, S. 388-393].

Die Gattung der Vibrionen umfasst gramnegative, nichtsporenbildende, starre, gerade oder gekrümmte Stäbchenbakterien, die eine oder mehrere polar angeordnete Geißeln tragen und somit lebhaft beweglich sind. Zu dieser Gattung gehört auch die Spezies *Vibrio parahaemolyticus* [Hof und Dörries, 2000, S. 388-393], die 1950 entdeckt wurde und 1958 erstmals aus dem Stuhl eines Patienten kultiviert werden konnte.

Der natürliche Lebensbereich dieser halophilen<sup>2</sup> Bakterien umfasst erstaunlicherweise nicht nur Salzwassergebiete wie Küstengewässer und Buchten, sondern durchaus auch brackige Süßwassergebiete auf beinahe der ganzen Welt. Allerdings benötigen sie Wassertemperaturen von 10-15 °C [Joseph et al., 1982; Hof und Dörries, 2000, S. 388-393].

Die Vibrionen gehen in ihrem Lebensraum enge Verbindungen mit anderen Meeresbewohnern ein. Sie können aus Fischen und Schalentieren isoliert werden. Ihre Konzentration ist in Schalentieren, die ihre Nahrung durch Filterung des Wassers gewinnen, wie etwa Austern, mit dem bis zu 100fachen Wert im Vergleich zu dem des umgebenden Wassers besonders hoch. In warmen Sommermonaten tragen beinahe 100% der Austern *V. vulnificus* und/oder *V. parahaemolyticus* in sich [Morris, 2003].

Das Überleben der Vibrionen in kalten Wintermonaten und ihr Wachstum im Sommer scheint von Copepoda abhängig zu sein [Joseph et al., 1982], Kleinstlebewesen und sogenannten „Insekten des Meeres“. Des Weiteren überwintern sie in Sedimenten und werden in hoher Anzahl in einer bestimmten Schneckenart, *Clithon retropictus*, gefunden. Hierunter finden sich auch die meisten zur Bildung des hitzestabilen Hämolysins befähigten Vibrionen [Kumazawa und Kato, 1985].

---

<sup>1</sup> Aus dem Lateinischen von vibrare = sich schnell hin- und herbewegen, vibrieren

<sup>2</sup> halophil = salzliebend

*V. parahaemolyticus* ist einer der bedeutendsten Erreger von Lebensmittelvergiftungen, die eine Gastroenteritis zur Folge haben. So ist er für 20-30% aller durch den Verzehr von nicht oder nicht ausreichend gegarten Meeresfrüchten verursachten Gastroenteritiden in Japan verantwortlich. Hier verursacht er die sogenannte „Sommer Diarrhoe“ und auch Reisediarrhoen [Morris, 2003; Alam et al., 2003; Joseph et al., 1982].

Der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *V. parahaemolyticus* ist das von ihm gebildete, hitzestabile Hämolysin Kanagawa (Benennung nach japanischem Regierungsbezirk Kanagawa). Dieses Hämolysin kann bei den meisten klinisch apparenten Stämmen nachgewiesen werden. Bei den im Freiland isolierten Vibrionen tritt es nur sehr selten auf [Alam et al., 2003; Okuda und Nishibuchi, 1998].

Nach einer Inkubationszeit von 4-90 h treten Symptome wie Diarrhoe (98%), Bauchkrämpfe (89%), Übelkeit (76%), Erbrechen (55%) und Fieber (52%) auf. 29% der Patienten berichten von blutigen Durchfällen [Morris, 2003].

Insbesondere bei nicht immunkompetenten Personen oder Personen mit Lebererkrankungen, Alkoholismus oder Diabetes werden auch Wundinfektionen und Sepsis beobachtet [Morris, 2003].

Die Erkrankung klingt in den meisten Fällen innerhalb von 8 bis 12 Tagen von selbst ab, so dass nur eine symptomatische Therapie nötig ist. Zusätzlich kann mit Chinolonen oder Tetrazyklinen therapiert werden. Trotzdem wird immer wieder von Todesfällen berichtet [Morris, 2003; Hof und Dörries, 2000, S. 388-393].

Der Nachweis der Erreger gelingt aus dem Stuhl der Infizierten (Selektion durch Zusatz von 6,5% NaCl zum Nährmedium) auf einfachen Nährböden bei 37 °C [Hof und Dörries, 2000, 388-393].

### 1.2 Hämolyisin Kanagawa und das Kanagawa Phänomen

Das Hämolyisin Kanagawa (auch TDH = thermostable direct hemolysin) ist ein von *Vibrio parahaemolyticus* produziertes, hitzestabiles (keine Inaktivierung bei 100 °C über 10 min.), monodimeres Protein. Sein Molekulargewicht liegt bei 46 kDa [Fabbri et al., 1999; Douet et al., 1992].

Erhöhter NaCl-Gehalt und Zugabe von fermentierbaren Kohlenhydraten zum Kulturmedium erhöhen die Produktion des Hämolyisins durch *V. parahaemolyticus* und senken gleichzeitig den pH-Wert des Mediums [Chun et al., 1975].

TDH ist einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *V. parahaemolyticus*, da es bei den meisten der aus Patientenstuhl gewonnenen Vibrionenkulturen nachgewiesen werden kann, bei den meisten in der freien Natur vorkommenden Stämmen jedoch nicht [Okuda und Nishibuchi, 1998; Hoashi et al., 1990; Yoh et al., 1992].

Der Nachweis des Toxins gelingt durch das sogenannte „Kanagawa Phänomen“ [Joseph et al., 1982].

Hierbei kommt es auf einem speziellen Nährmedium, dem Wagatsuma Agar, zu ausgeprägter  $\beta$ -Hämolyse [Okuda und Nishibuchi, 1998]. Die Produktion des TDH wird durch den pH-Wert im Medium kontrolliert und ist in einem Bereich von pH 6,5-5,5 am ausgeprägtesten. Genau dieser pH-Wert wird durch Mannitol, den Zucker, der im Wagatsuma Agar verwendet wird, erreicht [Cherwonogrodzky und Clark, 1981].

TDH ist ein porenbildendes Toxin, das bei verschiedensten Säugetierspezies zu Hämolyse und Zytolyse führt [Douet et al., 1992; Fabbri et al., 1999; Honda et al., 1992; Sakurai et al., 1976; Baba et al., 1992; Yoh et al., 1991; Huntley et al., 1997; Nishibuchi et al., 1992; Tang et al., 1997].

Dabei wird in der Anfangsphase die Permeabilität der Membran für Kationen erhöht, in der Spätphase kann die Hämolyse durch Zugabe von Sorbitol, einem Osmolyt, zum extrazellulären Medium verhindert werden [Huntley et al., 1993; 1996].

Bei Rat-1 Zellen, die mit TDH behandelt werden, können Anzeichen einer Apoptoseinduktion beobachtet werden. So kommt es zu Zellschrumpfung, Verkleinerung des Kerns, Verdichtung des Chromatins und DNA-Fragmentierung [Naim et al., 2001b].

Die Wirkung auf Myokardzellen besteht in einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit und damit einhergehender reversibler Depolarisation, vor allem verursacht durch  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  und zu einem verstärkten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch [Seyama et al., 1976; 1977].

Niedrige Konzentrationen des Toxins stoppen das spontane Schlagen von Mäuse- und Ratten-Myokardzellen in Kultur durch die Depolarisierung des maximalen diastolischen Potentials und verhindern damit die Entstehung eines Aktionspotentials. Hohe Konzentrationen führen hingegen zu morphologischen Schäden an den Myokardzellen. Intravenöse Applikation hat eine Unterdrückung der intraatrialen und intraventrikulären elektrischen Leitfähigkeit bis hin zum atrioventrikulären Block zur Folge [Goshima et al., 1976; Honda et al., 1976].

TDH bewirkt in Zellen des Darms einen Ioneneinstrom, hauptsächlich bestehend aus  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit nachfolgender Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion und damit verbundener Flüssigkeitssekretion in das Darmlumen, die durch DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure), einen Blocker  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, inhibiert werden kann. In höheren Konzentrationen verursacht TDH einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Zelltod [Douet et al., 1992; Raimondi et al., 1995; 2000; Takahashi et al., 2000b].

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *Vibrio parahaemolyticus* scheint das TDH-related hemolysin TRH zu sein. Dieses hitzelabile (Inaktivierung bei 60°C für 10 min) Toxin kann in Patienten mit Gastroenteritis und Kanagawa-Phänomen-negativen Vibrionen nachgewiesen werden. Es ist in der Lage in menschlichen Darmepithelien in gleicher Weise wie TDH über die Bildung von Poren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$  Kanäle zu öffnen [Lang et al., 2003a].

### 1.3 Apoptose bei kernhaltigen Zellen

#### 1.3.1 Physiologische Bedeutung der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein Vorgang, bei dem einzelne geschädigte Zellen eine Art Selbstzerstörungsprogramm aktivieren können, ohne dass es im Körper zu einer Entzündungsreaktion kommt.

Dieses Phänomen spielt eine wichtige Rolle bei verschiedensten Vorgängen im Organismus wie etwa dem Abbau von Tumorzellen, in der Embryogenese oder bei der Zerstörung autoreaktiver Thymozyten.

Die Zelle zerfällt hierbei in kleinere membranumschlossene Gebilde, sogenannte apoptotische Körperchen, die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten und somit verhindern, dass zelluläre Proteine vor der anschließenden rezeptorvermittelten Phagozytose freigesetzt werden, was die Aktivierung von Entzündungszellen zur Folge hätte.

Verschiedenste Faktoren können Zellen in die Apoptose treiben. Hierzu zählen UV-Strahlung, Gifte, Hitzeschock,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Behandlung mit Ceramid, der Entzug spezieller Wachstumsfaktoren (z.B. Interleukin-2 oder nerve growth factor NGF), Bakterien und Viren [Gulbins et al., 2000].

Dieses Selbstmordprogramm ist ein biologischer Prozess, der die Aktivierung mehrerer Signalkaskaden und deren Steuerung voraussetzt. Die Bedeutung der Apoptose für den Organismus wird besonders deutlich, wenn man bedenkt, welche Krankheiten entstehen, sollte es hier zu Störungen kommen. Eine zu frühe oder unnötige Apoptoseinduktion wird normalerweise von Proteinen verhindert, die der bcl-2 Genfamilie angehören. Einige Viren, darunter das Epstein-Barr-Virus, das afrikanische Schweinefiebertvirus und das Pferdeherpesvirus, können Proteine produzieren, deren Sequenzen sehr starke Ähnlichkeiten mit derjenigen des bcl-2 aufweisen. Hiermit sind sie in der Lage, die Apoptose befallener Zellen zu hemmen. Einige Viren können somit die Entstehung von Tumoren verursachen [Lang, 2000, S. 357; Gulbins et al., 2000].

Die morphologischen Veränderungen, die in apoptotischen Zellen sichtbar werden, sind vor allem Zell- und Kernschrumpfung, Fragmentierung der DNA durch  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen in nukleosomale Einheiten von 200 Basenpaaren Länge, Chromatinkondensation, Bildung von Membranausstülpungen, das Erscheinen sogenannter Apoptosekörperchen, Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite und der Zerfall der Mitochondrien. Letztendlich kommt es dann zur rezeptorvermittelten Phagozytose der abgestorbenen Zelle durch Makrophagen. Da bei diesem Vorgang keinerlei intrazelluläre Makromoleküle freigesetzt werden, kommt es nicht zu einer Entzündungsreaktion [Lang, 2000, S. 357; Gulbins et al., 2000; Bratosin et al., 2001].

Andere Kennzeichen apoptotischer Zellen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und der Verlust an intrazellulärem  $\text{K}^+$ .

# 1. Einleitung

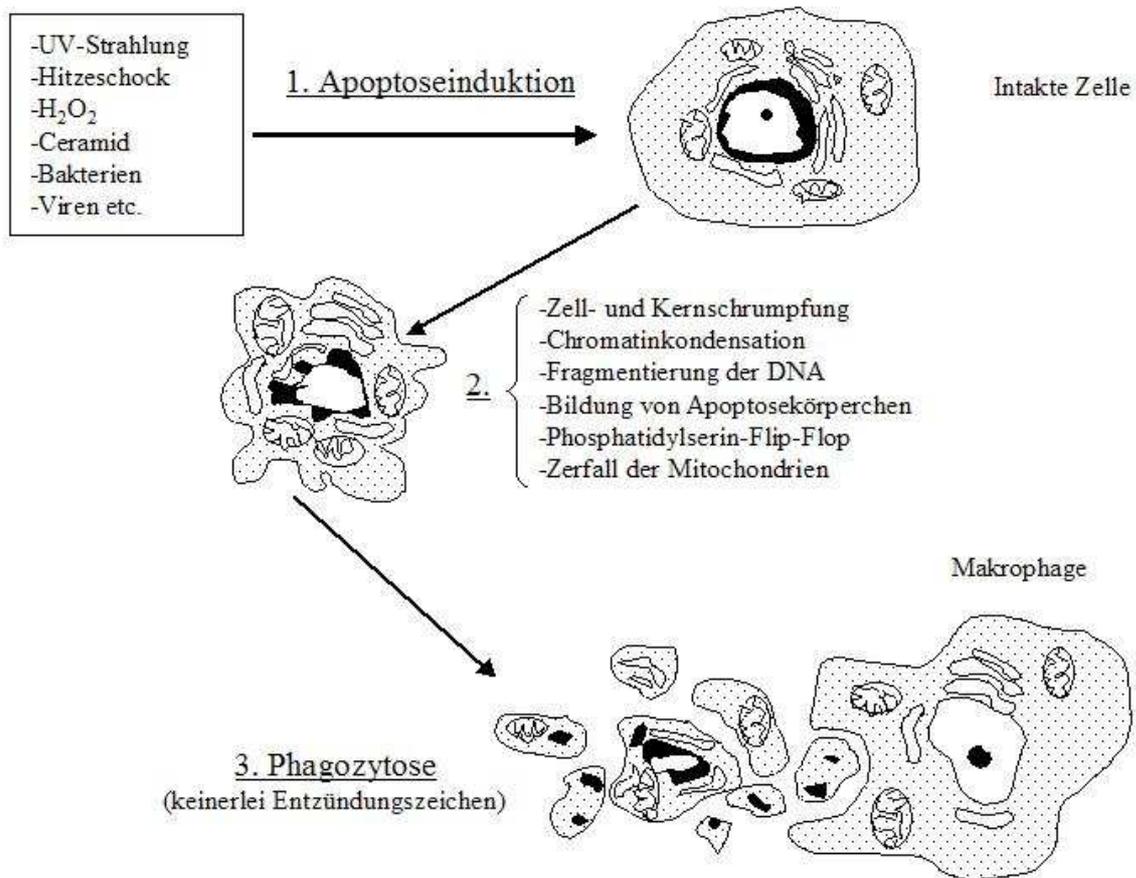


Abb. 1: Schematische Darstellung morphologischer Veränderungen apoptotischer Zellen.

Als Folge der Apoptoseinduktion durch schädigende Einflüsse kommt es zu Kern- und Zellschrumpfung mit anschließender Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA und der Ausbildung sogenannter Apoptosekörperchen. Der Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite leitet die rezeptorvermittelte Phagozytose durch Makrophagen ein. Hierbei werden keine intrazellulären Proteine freigesetzt, eine Entzündungsreaktion unterbleibt.

### 1.3.2 Todesrezeptoren – Angehörige der TNF-Rezeptor-Superfamilie

Die sogenannten Todesrezeptoren, auch death receptors genannt, gehören der Familie der TNF-Rezeptor-Superfamilie an und bewirken über die Aktivierung der Caspase-Kaskade die Apoptoseeinleitung. Sie stehen am Anfang des ersten Teils der Apoptose, der sogenannten Initiationsphase [Ashkenazi und Dixit, 1998; Chinnaiyan et al., 1996; Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992].

Diese Rezeptoren ähneln sich in ihrer Proteinstruktur. So besitzen sie cysteinreiche extrazelluläre Domänen mit repetitiven homologen Grundeinheiten von 40 Aminosäuren. Essentieller Strukturbestandteil ist die sogenannte intrazelluläre Todesdomäne, auch als death domain bezeichnet, die das apoptotische Signal weiterleitet. Eine solche besitzen CD95 (APO-1, FAS), TRAMP (DR3, wsl-1, APO-3, LARD), TNF-R1 (CD120a), TRAIL-R1 (DR4, APO-2) und TRAIL-R2 (DR5). [Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992]

Die TRAIL-Rezeptoren binden als Liganden TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) und sind eng mit dem CD95-Rezeptor verwandt. Weitere Liganden der Todesrezeptoren sind CD95L, TNF, Lymphotoxin- $\alpha$  (LT $\alpha$ , TNF $\beta$ ). Sie aktivieren ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung [Beutler und van Huffel, 1994; Wiley et al., 1995; Eck et al., 1992; Jones et al., 1992; Banner et al., 1993; Dhein et al., 1992].

Die Bedeutung für eine fehlerfreie Regulation der Apoptose auf Rezeptor- und Ligandenebene wird bei Patienten mit autoimmun lymphoproliferativem Syndrom deutlich, bei denen die Symptome durch einen Defekt des CD95-Rezeptors verursacht werden [Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995; Drappa et al., 1996].

Nach Transplantation von Sertoli- und Korneazellen exprimieren diese CD95-Ligand, was zur Elimination von Lymphozyten und Granulozyten durch die CD95-Aktivierung beim Empfänger führt und somit das Transplantat vor Abstoßung schützt [Griffith et al., 1995; 1996; Bellgrau et al., 1995].

Dieser Schutzmechanismus wird auch bei bestimmten Tumorzellen diskutiert. TRAIL vermittelt den Aktivierungs-induzierten Tod von T-Zellen und kann für die Elimination von T-Lymphozyten bei HIV-Infizierten verantwortlich sein [Marsters et al., 1996a; 1996b; Katsikis et al., 1997; Jeremias et al., 1998].

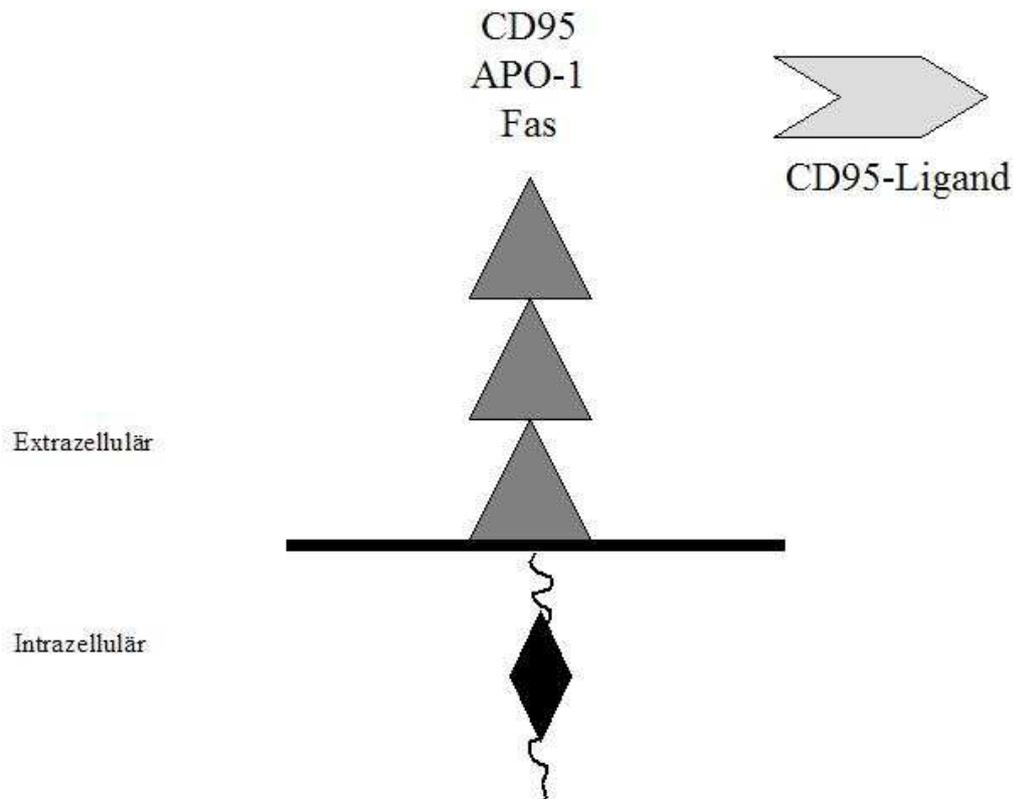


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Todesrezeptors am Beispiel des CD95.

Typischer Aufbau eines Todesrezeptors der TNF-Rezeptor-Superfamilie mit intrazellulärer Todesdomäne DD (schwarze Spindel) und cysteinreichen extrazellulären Domänen (graue Dreiecke).

### 1.3.3 Rezeptor-vermittelte Signalwege in der Apoptose

Über den CD95-Signalweg aktiviert die Bindung des CD95-Liganden an seinen Rezeptor diesen und führt zu einer Trimerisierung, was zum Einen die Bildung des Todessignal-Komplexes DISC (death inducing signaling complex) und zum Anderen die Bindung von FADD (Fas-associating protein with death domain) an CD95 zur Folge hat.

Die Todeseffektordomäne DED (death effector domain) des FADD bindet nun an die DED von Caspase 8 [Arends et al., 1990; Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996].

Caspase 8 wird durch partielle Proteolyse aktiviert und spaltet andere Caspasen mit dem Ziel der Spaltung für die Apoptose wichtiger Substrate. Es löst darüber das Selbstmordprogramm aus [Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996].

Auch TRAIL-R1 und TRAIL-R2 aktivieren Caspase 8 und Caspase 10 [Pan et al., 1997].

Zum anderen kann das Adapterprotein RAIDD mit C-terminaler Todesdomäne und N-terminaler CARD-Domäne (Caspase-Rekrutierungsdomäne) nach Bindung an die Todesdomäne des CD95-Rezeptors die CARD-Domäne von Caspase 2 binden und ebenfalls über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade Apoptose auslösen [Duan und Dixit, 1997; Ahmad et al., 1997].

Des weiteren löst eine Überexpression des Proteins Daxx, das spezifisch die Todesdomäne von CD95 bindet, Apoptose über die Aktivierung der Caspasen-Kaskade aus und verstärkt diese durch eine Stimulation der MAP-Kinasen JNK (c-Jun N-terminal kinase) und SAPK (stress-activated protein kinase) [Yang et al., 1997].

Ein weiterer möglicher Signalweg der Apoptoseinduktion läuft über den TNF-Rezeptor. Eine Bindung von TNF an seinen Rezeptor führt ebenfalls zur Trimerisierung des Rezeptors und dessen Aktivierung. Die Proteine TRADD und RIP binden mit ihrer DD an die DD von TNF-R1, FADD bindet an den DISC, was nun wiederum mit seiner DED diejenige der Procaspase-8 bindet und diese durch proteolytische Spaltung aktiviert. Auch hier erfolgt eine Aktivierung der Caspase-Kaskade mit anschließender Apoptosedurchführung [Stanger et al., 1995].

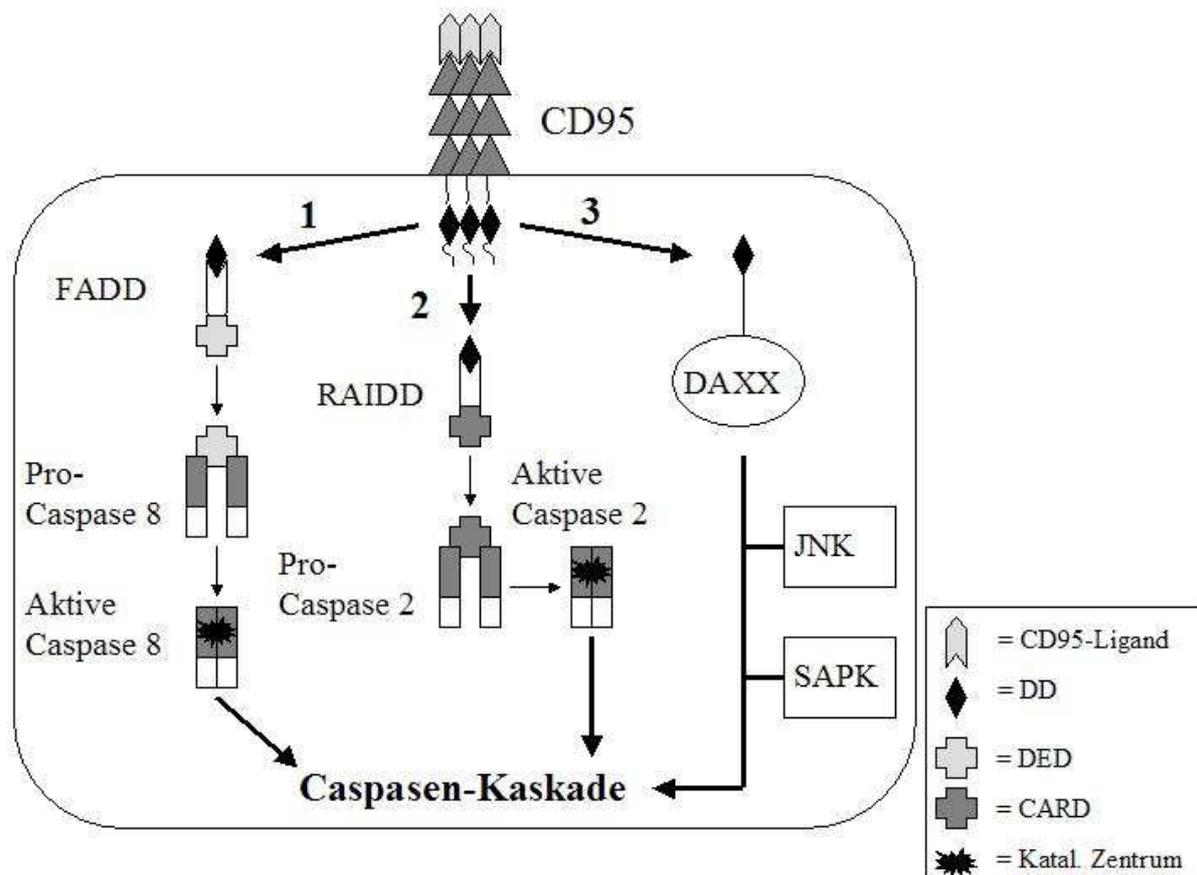


Abb. 3: Schematische Darstellung eines möglichen rezeptorvermittelten Apoptose-Signalweges am Beispiel des CD95-Rezeptors.

Bindet der CD95-Ligand an seinen Rezeptor, so kommt es zu einer Trimerisierung und Aktivierung. Das Adapterprotein FADD bindet mit seiner Todesdomäne (DD) an diejenige des CD95 und mit seiner Todeseffektordomäne (DED) an diejenige der Pro-Caspase 8. Diese wird aktiviert und startet die Caspase-Kaskade (1). Das Adapterprotein RAIDD ist ebenfalls in der Lage, nach der Bindung seiner Todesdomäne an den CD95, mittels seiner Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD) eine Caspase, in diesem Fall die Pro-Caspase 2, zu aktivieren und damit die Caspasen-Kaskade zu starten (2). Auch eine Überexpression des Proteins Daxx setzt die Caspasen-Kaskade in Gang und verstärkt diese mit Hilfe der MAP-Kinasen JNK und SAPK (3).

### 1.3.4 Caspasen und Apoptose

Die Apoptoseauslösung führt über spezifische Rezeptormoleküle wie z.B. CD95, TRAIL, TNF-R1, TNF-R2 oder TRAMP und führt fast immer zur Aktivierung einiger spezieller Proteasen, den Caspasen. Der Name leitet sich davon ab, dass diese Cysteinproteasen ihre Zielproteine an Asparaginresten schneiden. Sie werden selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert. Das aktivierte Enzym setzt sich aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten zusammen (20 kDa und 10 kDa) [Gulbins et al., 2000; Schulze-Osthoff et al., 1998; Cohen, 1997; Nicholson und Thornberry, 1997].

Die Caspasen bilden wohl eine mit dem Komplementsystem vergleichbare proteolytische Kaskade zur Verstärkung des apoptotischen Stimulus. Wie viele verschiedene Caspasen beim Menschen existieren, konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

Caspasen schneiden DNA-Reparaturenzyme, heteronukleäre Ribonukleoproteine C, Teile des DNA-Replikationskomplexes, Proteine im Nukleus und Strukturproteine des Zytoskeletts. Die DNA-Fragmentation erfolgt durch die CAD (caspase activated DNase) [Cohen, 1997; Nicholson und Thornberry, 1997; Enari et al., 1998; Schulze-Osthoff et al., 1998].

Caspasen werden aufgrund von Struktur und Funktion in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe sind die sogenannten Initiator-Caspasen. Zu ihnen zählen die Caspase 8 und die Caspase 10, die durch den Besitz der DED die FADD-vermittelte Bindung an den DISC ermöglichen [Pan et al., 1997; Muzio et al., 1996; Medema et al., 1997].

In der Exekutionsphase der Apoptose werden Caspasen der zweiten Gruppe, sogenannte Effektor-Caspasen, ebenfalls durch proteolytische Spaltung aktiviert. Dies führt letztendlich über die Spaltung der verschiedenen Zielsubstrate zu den typischen apoptotischen Veränderungen [Gulbins et al., 2000].

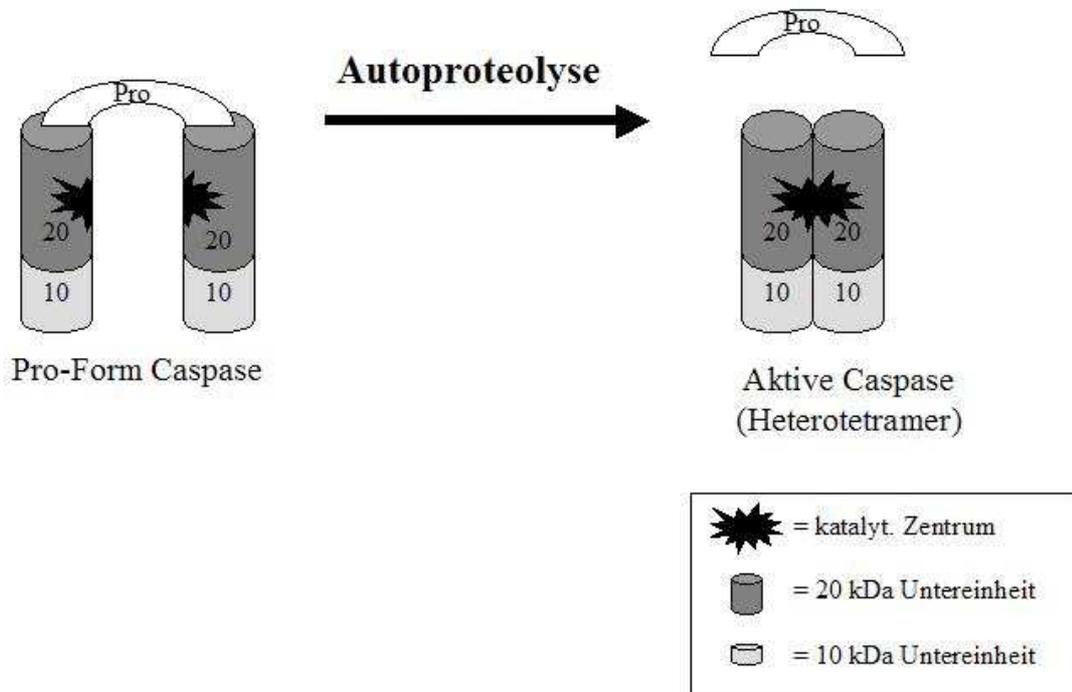


Abb. 4: Schematische Darstellung der autoproteolytischen Aktivierung einer Caspase.

Die aus zwei Untereinheiten zu 20 kDa und 10 kDa bestehende Caspase aktiviert ihr katalytisches Zentrum durch Autoproteolyse und ist nun bereit, in der Caspase-Kaskade nachfolgende oder auch finale Substrate ebenfalls durch proteolytische Spaltung zu aktivieren.

### 1.3.5 Mitochondrien-vermittelte Apoptose

Nach der bereits beschriebenen Aktivierung der Initiator-Caspasen kann die Apoptose auch über einen mitochondrialen Weg induziert werden. Hierbei spaltet die Caspase 8 ein pro-apoptotisches Mitglied der bcl-2-Familie, das sogenannte Bid. Dieses transloziert in das Mitochondrium und führt zur Freisetzung von Cytochrom c, welches im Zytosol zusammen mit ATP an Apaf-1 (apoptotic protease-activating Factor-1) bindet [Zou et al., 1997; Scaffidi et al., 1998; Lou et al., 1998; Li et al., 1998].

Diese Bindung bewirkt die Freilegung der CARD (Caspase-Rekrutierungsdomäne) des Apaf-1. Hierdurch kann nun das Apaf-1 an die CARD der Caspase 9 binden, die sich durch Autoproteolyse aktiviert und die Caspase-Kaskade in Gang setzen kann.

Die Blockade dieses Signalweges ist (im Gegensatz zum CD95-Signalweg) mittels anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder möglich, die die Freisetzung des Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindern [Scaffidi et al., 1998; Schulze-Osthoff et al., 1998].

Die Mitochondrien spielen allerdings auch noch auf eine andere Art eine wichtige Rolle innerhalb der Apoptose.

So kommt es im Verlauf des programmierten Selbstmords zu einer Veränderung der mitochondrialen Struktur und Funktionsweise [Petit et al., 1997].

Dies äußert sich über den Zusammenbruch des Potentials der inneren Mitochondrienmembran und einer erhöhten Membranpermeabilität aufgrund der Bildung spezieller Poren. Die Folgen dieser Veränderungen sind unter anderem die Entkopplung der Atmungskette, die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen, die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  und Glutathion aus dem mitochondrialen Matrixraum und der Verlust löslicher Intermembranproteine. Hierauf kommt es zur Aktivierung und vermutlich auch Freisetzung von speziellen Apoptose-vermittelnden Proteasen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Diese Proteasen sind in der Lage Endonukleasen zu aktivieren, die letztendlich in der Exekutionsphase die DNA in nucleosomale Einheiten von 200 Basenpaaren Länge schneiden, was unmittelbar den Zelltod zur Folge hat. Diese Ereignisse unterliegen der Kontrolle von Mitgliedern der bcl-2 Familie in der äußeren Mitochondrienmembran, die sowohl den Permeabilitätsverlust, als auch die Cytochrom c-Freisetzung und damit den weiteren Fortgang der Apoptose verhindern können [Hirsch et al., 1997; Zanzami et al., 1997; Susin et al., 1997;].

### 1.3.6 Sphingomyelin-vermittelte Apoptose

Drei verschiedene Sphingomyelinasen werden anhand ihres pH-Optimums unterschieden: eine neutrale (pH-Optimum bei 7,4; Sitz in Plasmamembran), eine alkalische (pH-Optimum bei 9,0; Dünndarm-assoziiert) und eine saure (pH-Optimum 5,0; Vorkommen in Lysosomen und sekretorischen Vesikeln).

Davon kommt besonders der sauren und der neutralen Sphingomyelinase eine entscheidende Rolle in der Apoptose zu, während die alkalische Sphingomyelinase in der Apoptose keine Rolle spielt.

Diese Enzyme setzen durch Hydrolyse von Sphingomyelin in der Membran Ceramid und Phosphorylcholin frei. Das Ceramid aktiviert als sekundärer Botenstoff andere Proteine, wie Ceramid-aktivierte Proteinkinase (CAP-Kinase), Ceramid-aktivierte Phosphatase (Phosphatase-2A), Proteinkinase C $\xi$  und Raf-1, und setzt somit die Apoptose in Gang. Darüber hinaus führt Ceramid zur Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, was zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade beiträgt und somit auch die Apoptose der Zelle zur Folge hat [Gulbins et al., 2000; Haimovitz-Friedman et al., 1994; Bose et al., 1995; Cifone et al., 1995; Wiegmann et al., 1994; Gulbins et al., 1995; Löffler und Petrides, 1998, S. 462].

Die Hydrolyse des Sphingomyelin und die anschließende Neusynthese durch die Sphingomyelin-Synthase aus Phosphatidylcholin unter Abspaltung von Diacylglycerol wird als Sphingomyelin-Zyklus zusammengefasst.

Die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase erfolgt durch verschiedenste Arten von Stress. Hierzu zählen Gamma- und Ultraviolettstrahlung genauso wie die Behandlung mit Zytostatika, Hitzeschock, Infektionen oder Mangel an Wachstumsfaktoren [Hannun und Luberto, 2000; Hannun, 1996].

Auch kann sie durch den CD28-Rezeptor, der Zellproliferation und Differenzierung steuert, aktiviert werden, was zeigt, dass ihr nicht nur in der Apoptose eine wichtige Rolle zufällt.

Sie scheint auch die Membranfluidität zu verändern, indem sie Domänen mit höherem Ceramidgehalt schafft, was den Signalfluss vom Rezeptor ins Innere der Zelle verbessert [Gulbins et al., 2000].

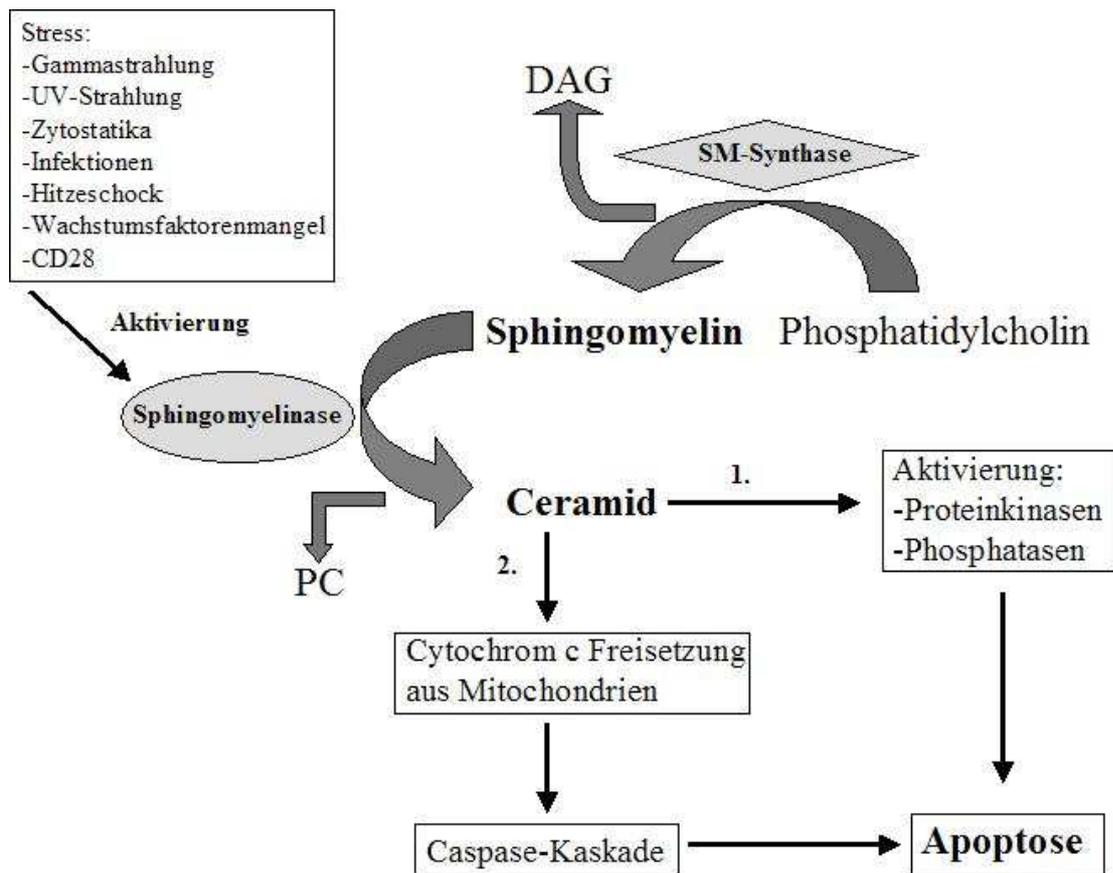


Abb. 5: Sphingomyelin-Zyklus und Ceramid als second messenger.

Auf verschiedenste schädigende Einflüsse hin wird die Sphingomyelinase aktiviert, die nun Sphingomyelin der Membran unter Abspaltung von Phosphorylcholin (PC) zu Ceramid hydrolysiert. Dieses führt 1. über die Aktivierung verschiedener Enzyme und 2. über die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien mit nachfolgender Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Einleitung der Apoptose. Des weiteren dargestellt die Synthese des Sphingomyelins aus Phosphatidylcholin unter Abspaltung von Diacylglycerol (DAG) mittels der Sphingomyelin-Synthase (SM-Synthase).

## **1.4 Apoptose bei kernlosen Zellen: Erythrozyten**

### **1.4.1 Voraussetzungen für Apoptose bei Erythrozyten**

Erythrozyten, die weder über Organellen noch über einen Zellkern verfügen, die auf verschiedenste Apoptosestimuli hin keine Aktivierung von Caspase 3 oder Caspase 8 (durchaus nachweisbar in Erythrozyten) zeigen und die weder über Caspase 9, Apaf-1 noch Cytochrom c verfügen, sind durchaus in der Lage, wie alle anderen Säugetierzellen auf schädigende Einflüsse hin in Apoptose zu gehen [Bratosin et al., 2001; Berg et al., 2001].

Dabei zeigen sie morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung und den Zusammenbruch der Phosphatidylserinasymmetrie in der Membran, die auch bei apoptotischen, kernhaltigen Zellen zu finden sind [Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001].

Da diese Veränderungen ebenfalls nach der Behandlung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin zu beobachten sind, kann davon ausgegangen werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch unspezifische Kationkanäle, der unter physiologischen Bedingungen tatsächlich zu beobachten ist, bei Erythrozyten die Apoptose einleitet [Lang et al., 2003a].

### **1.4.2 Membranpotential bei Erythrozyten**

Wie bei allen anderen Zellen auch ist bei menschlichen Erythrozyten ein Enzym in der Plasmamembran für die Entstehung eines für jeden Zelltyp spezifischen Membranpotentials verantwortlich. Dieses Enzym ist die sogenannte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , die mittels Spaltung von ATP Energie gewinnt, um 3  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus und im Austausch 2  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle hinein zu transportieren. Dadurch ergibt sich eine intrazelluläre Konzentration an  $\text{K}^+$ -Ionen von 140 mmol/l und an  $\text{Na}^+$ -Ionen von lediglich 10 mmol/l. Da die Konzentrationen im Plasma, d.h. im extrazellulären Medium, um ein Vielfaches von den Konzentrationen dieser beiden Ionen intrazellulär abweichen, ergeben sich chemische Gradienten, die versuchen, die Ionenkonzentrationen auszugleichen. So ist die Konzentration von  $\text{Na}^+$  extrazellulär 141 mmol/l und damit etwa 14 mal so groß wie intrazellulär, die Konzentration

## 1. Einleitung

---

von  $K^+$  liegt extrazellulär bei 4 mmol/l und ist damit um das 35fache kleiner als seine intrazelluläre Konzentration. Daraus ergibt sich ein nach innen gerichteter chemischer Gradient für  $Na^+$  und ein nach außen gerichteter chemischer Gradient für  $K^+$ .

Des Weiteren führt der Austausch von 3 positiv geladenen Ionen nach außen gegen 2 positiv geladene Ionen nach innen zu einer Negativierung des Intrazellulärtraumes und lässt somit zusätzlich einen elektrischen Gradienten, der  $K^+$  und  $Na^+$  aufgrund der positiven Ladung ins Zellinnere zu treiben versucht, entstehen.

Da die Leitfähigkeit der erythrozytären Membran für  $Na^+$  praktisch null und für  $K^+$  extrem gering ist, kommt bei der Einstellung des Ruhemembranpotentials besonders der ausgeprägten Leitfähigkeit für  $Cl^-$ -Ionen eine enorme Bedeutung zu. Dieses befindet sich intrazellulär in einer Konzentration von 70 mmol/l und extrazellulär in einer Konzentration von 103 mmol/l.

Damit entspricht das Ruhemembranpotential des Erythrozyten weitestgehend dem Gleichgewichtspotential von  $Cl^-$ . Nach der Nernst'schen Gleichung liegt dieses bei:

$$\begin{aligned} p &= - (R * T) / (z_i * F) \ln (c_i/c_a) & p_{Cl^-} &= - 61 \text{ mV} * -1 \lg ([Cl^-]_i/[Cl^-]_a) \\ &= - 61 \text{ mV} * z_i^{-1} \lg (c_i/c_a) & &= 61 \text{ mV} \lg (70/103) \\ & & &= - 10 \text{ mV}. \end{aligned}$$

Gl. 1: Nernst'sche Gleichung.

$p$  = Gleichgewichtspotential für ein Ion [V]

$F$  = Faraday-Konstante [ $10^5$  Cb/mol]

$R$  = Gaskonstante [8,3 J/(K\*mol)]

$c_i, c_a$  = Konzentration der Ionen innen und außen [mmol/l]

$T$  = absolute Temperatur [K]

$z_i$  = Ladung eines diffundierenden Teilchens

Werden nun  $K^+$ -Kanäle geöffnet, so wirken zwei unterschiedliche Gradienten auf die  $K^+$ -Ionen ein. Zum einen der nach innen gerichtete elektrische Gradient, der allerdings bei einem Ruhemembranpotential der Erythrozyten von nur  $-10$  mV aufgrund des  $K^+$ -Gleichgewichtspotentials, das bei  $-90$  mV liegt, nicht zum Tragen kommt. Zum anderen wirkt der chemische Gradient, der durch die verglichen mit dem Plasma 35fach höhere Konzentration der  $K^+$ -Ionen im Inneren der Zelle entsteht, auf die  $K^+$ -Ionen ein und treibt diese nach außen.

Nun verliert der Erythrozyt positive intrazelluläre Ladungen und hyperpolarisiert, da sein Intrazellulärtraum im Verhältnis zum Plasma noch negativer wird. Dies versucht die Zelle

durch den Ausstrom negativ geladener  $\text{Cl}^-$ -Ionen zu kompensieren. Dem  $\text{Cl}^-$  folgt allerdings osmotisch Wasser aus dem Inneren des Erythrozyten nach, was eine Zellschrumpfung zur Folge hat.

Öffnen sich hingegen  $\text{Na}^+$ -Kanäle, so strömt, sowohl durch den elektrischen als auch den chemischen Gradienten angetrieben,  $\text{Na}^+$  in die Zelle hinein und depolarisiert diese. Um nun die überzähligen positiven Ladungen im Zellinneren auszugleichen, strömt  $\text{Cl}^-$  in den Erythrozyten hinein, und Wasser folgt wiederum osmotisch nach, was in diesem Fall zur Zellschwellung führt [Lang, 2000, S. 153; Schmidt et al., 2000, S. 7-8].

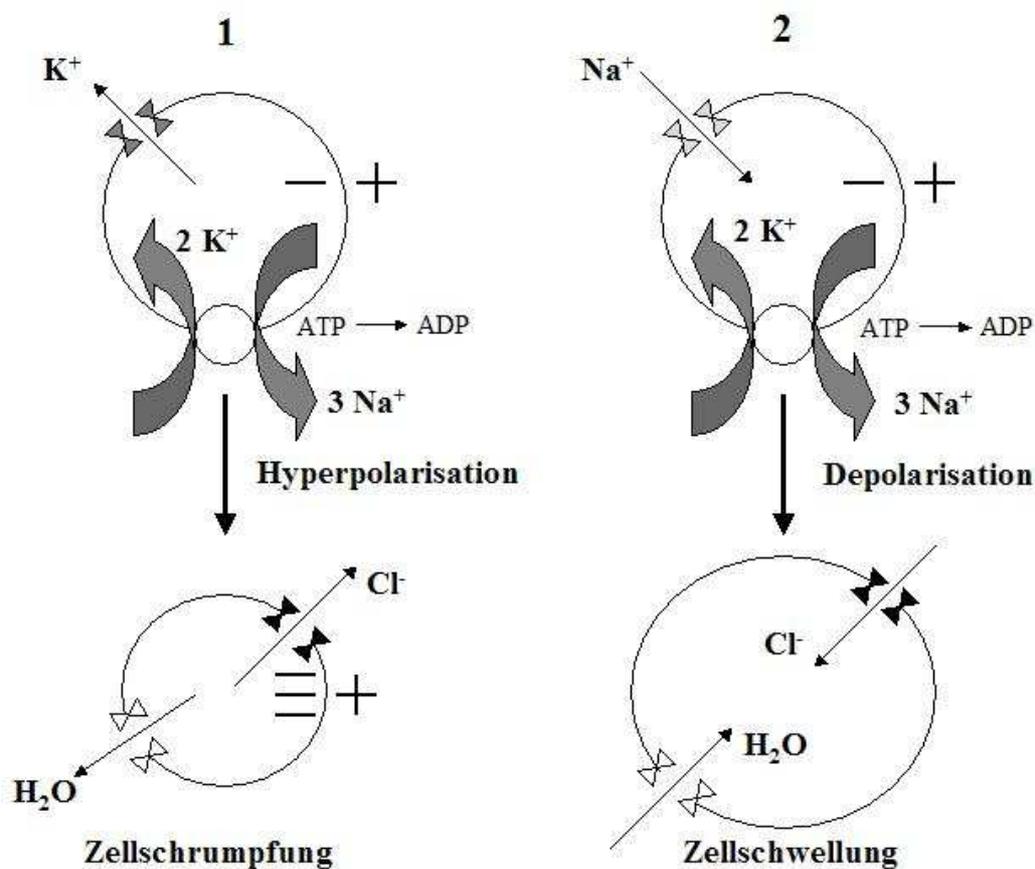


Abb. 6: Membranpotential bei Erythrozyten und Folgen des Öffnens von  $\text{K}^+$ - bzw.  $\text{Na}^+$ -Kanälen für das Zellvolumen.

Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase transportiert positive Ladungen vermehrt aus der Zelle heraus und schafft damit innen im Vergleich zu außen ein negativeres Niveau. Zusätzlich ist die Leitfähigkeit für  $\text{Cl}^-$  im Verhältnis zu den Leitfähigkeiten anderer Ionen dermaßen hoch, dass das Ruhemembranpotential dem  $\text{Cl}^-$ -Gleichgewichtspotential von  $-10 \text{ mV}$  entspricht. Öffnen sich  $\text{K}^+$ -Kanäle, so hyperpolarisiert die Zelle,  $\text{Cl}^-$  strömt aus, Wasser folgt osmotisch nach, es kommt zur Zellschrumpfung (1). Öffnen sich  $\text{Na}^+$ -Kanäle, so depolarisiert die Zelle,  $\text{Cl}^-$  strömt ein, Wasser folgt wiederum osmotisch nach, es kommt zur Zellschwellung (2).

### 1.4.3 Unspezifische Kationkanäle

Osmotischer Schock, oxidativer Stress und das Entfernen von intra- und extrazellulärem  $\text{Cl}^-$  öffnen unspezifische Kationkanäle, die für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind und somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration intrazellulär erhöhen [Duranton et al., 2002; Huber et al., 2001; Lang et al., 2003b].

Diese unspezifischen Kationkanäle können durch EIPA (N-Ethyl-isopropyl-amilorid), Amilorid und Erythropoietin gehemmt werden, wodurch ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhindert wird [Lang et al., 2003b; 2003c; Myssina et al., 2003].

Andere Ionen können ebenfalls passieren:  $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$  [Lang et al., 2003a].

Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt nun zur Aktivierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals, dem sogenannten Gardos-Kanal oder KCNN4, was einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom mit Hyperpolarisation der Membran zur Folge hat. Dies bewirkt nun seinerseits, dass  $\text{Cl}^-$  ausströmt und diesem osmotisch Wasser nachfolgt. Insgesamt kommt es hierbei zur Zellschrumpfung [Lang et al., 2003a].

Diese Kationkanäle spielen eine entscheidende Rolle im erythrozytären Apoptoseprogramm. Nicht nur die während der Apoptose zu beobachtende Zellschrumpfung, sondern auch die Exposition von Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite geschieht aufgrund der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. So aktiviert das  $\text{Ca}^{2+}$  ein membranständiges Enzym, die sogenannte Scramblase, die mittels des Phosphatidylserin-Flip-Flops die Verteilung des Phosphatidylserin innerhalb der beiden Membranblätter verändert und es vermehrt ins äußere Blatt transportiert. Die Exposition von Phosphatidylserin tritt, genau wie die Zellschrumpfung, als Folge der Apoptoseeinleitung auf und kann mittels Bindung des fluoreszenzmarkierten Annexin-V-Fluos nachgewiesen werden. Folge der Phosphatidylserinexposition ist die Phagozytose der geschädigten Zelle durch Makrophagen [Gulbins et al., 2000; Lang et al., 2003b; Berg et al., 2001].

Dass tatsächlich die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für diese Vorgänge verantwortlich ist, zeigt sich, wenn man das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin dem Medium zusetzt. Hierbei kommt es genau wie nach Aktivierung der unspezifischen Kationkanäle zu Zellschrumpfung und Annexin-Bindung an das exponierte Phosphatidylserin. Entfernt man hingegen das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ , so ist kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom möglich, und die Zellschrumpfung unterbleibt [Lang et al., 2003a].

Bei der durch osmotischen Schock ausgelösten Apoptose des Erythrozyten konnte erst kürzlich eine weitere Besonderheit festgestellt werden. So wird, entfernt man das extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ , die Annexin-Bindung zwar reduziert, sie verschwindet jedoch nicht vollständig. Dies ist auf eine zusätzliche Aktivierung der Sphingomyelinase und anschließende Ceramidproduktion zurückzuführen. Die Apoptose nach osmotischem Schock verläuft also über zwei unterschiedliche Signalwege [Lang et al., 2004a].

Da Erythrozyten beim Durchlauf durch das Nierenmark regelmäßig hyperosmolaren Bedingungen ausgesetzt werden und somit die Gefahr der Apoptoseinduktion gegeben ist, wirken die hier ebenfalls vorhandenen Stoffe Chlorid und Harnstoff antiapoptotisch. Chlorid wirkt über die Hemmung der Kationleitfähigkeit und Harnstoff über die Blockade der Sphingomyelinase [Lang et al., 2004b].

### **1.4.4 Ein $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger $\text{K}^+$ -Kanal: Der Gardos-Kanal**

$\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Leitfähigkeiten in drei Gruppen eingeteilt. Hierbei werden Kanäle von kleiner (SK), mittlerer (IK) und großer (BK) Leitfähigkeit unterschieden.

Der erste dieser Kanäle, der jemals beschrieben wurde, gehört zur Gruppe von mittlerer Leitfähigkeit und wird als Gardos-Kanal (KCNN4) bezeichnet. Er wird vorwiegend in Blutzellen, Epithelien und Endothelien exprimiert. Auch Erythrozyten tragen ihn in ihrer Membran. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität ergibt sich aus gebundenem Calmodulin. Diese  $\text{K}^+$ -Kanäle können durch das Skorpiongift Charybdotoxin und durch das Antimykotikum Clotrimazol gehemmt werden [Jensen et al., 2001; Lang et al., 2003c, d; Kaiserova et al., 2002; Anfinogenova et al., 2001; Brugnara, 1997; Brugnara et al., 1996; Li et al., 1996; Maher und Kuchel, 2003; Johnson und Tang, 1992].

Wird dieser Kanal nun durch steigende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert, so kommt es zu einem  $\text{K}^+$ -Verlust mit Hyperpolarisation der Membran; dieses wiederum treibt  $\text{Cl}^-$  und damit auch osmotisch Wasser aus der Zelle heraus und hat somit eine Schrumpfung des Erythrozyten zur Folge.

Eine Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration limitiert den Gradienten für den  $K^+$ -Ausstrom und verhindert damit die Hyperpolarisation mit anschließendem  $Cl^-$ - und Wasserausstrom und somit auch die Zellschrumpfung [Lang et al., 2003c, d].

Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Gardos-Kanal auch nach Behandlung der Zelle mit Energiedepletion, oxidativem Stress, osmotischem Schock und  $Cl^-$ -Depletion aktiviert wird. Dies ergibt sich aus dem Zusammenspiel mit den oben genannten unselektiven Kationkanälen, die sich auf solche schädigenden Einflüsse hin öffnen und somit die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration erhöhen. Damit erklärt sich die Zellschrumpfung von Erythrozyten nach Apoptose-induzierenden Ereignissen [Lang et al., 2003d; Berkowitz und Orringer, 1984].

## 1. Einleitung

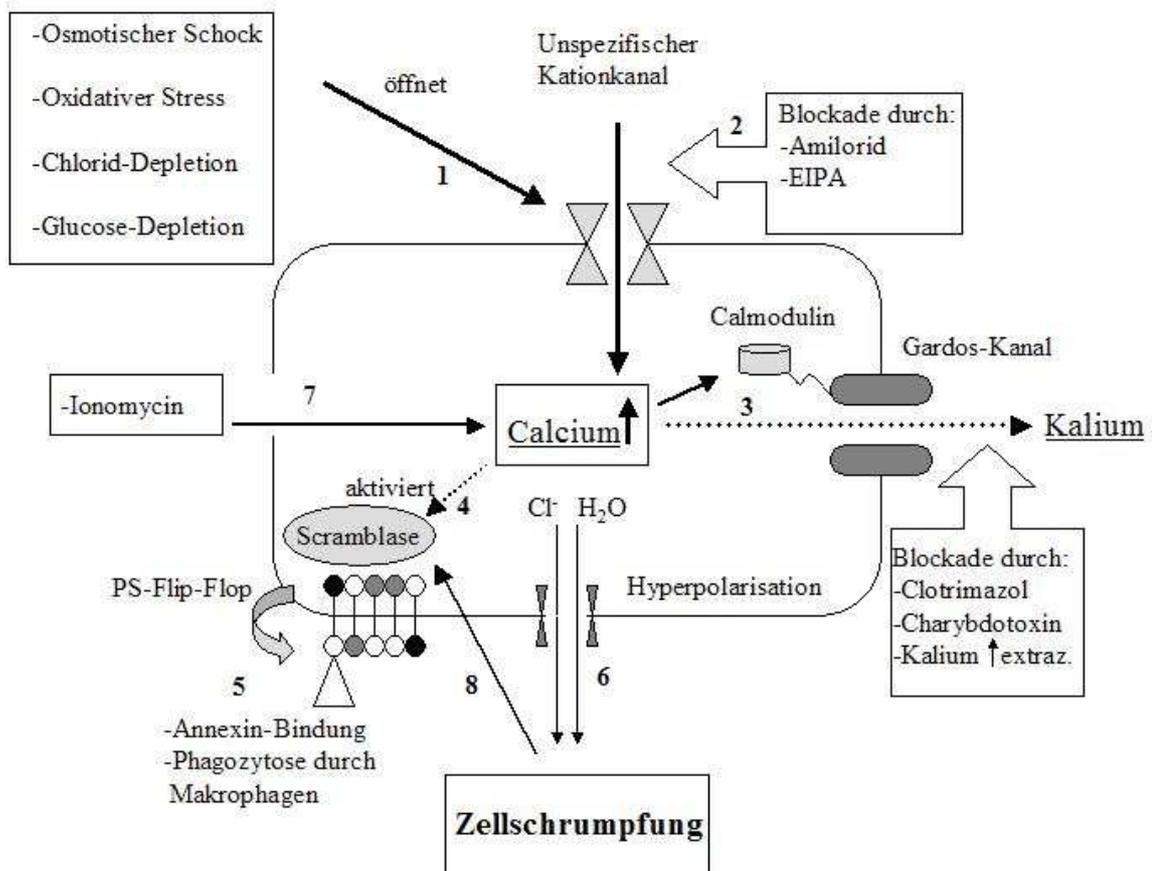


Abb. 7: Schematische Vorgänge, verbunden mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

Verschiedenste Faktoren führen zum Öffnen unspezifischer Kationkanäle, die die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erhöhen (1). Eine Blockade dieser Kanäle ist durch EIPA und Amilorid möglich (2). Zum Einen bindet sich das Kalzium an Calmodulin, das mit dem Gardos-Kanal verbunden ist und bewirkt dessen Aktivierung mit der Konsequenz des massiven K<sup>+</sup>-Ausstroms (3), zum Anderen führt es bei einem membranständigen Enzym, der Scramblase, zu einer Konformationsänderung und ebenfalls zu dessen Aktivierung (4). Die Scramblase exponiert Phosphatidylserin (PS) ins äußere Blatt der Membran, woran Annexin-V bindet, das im Durchflusszytometer gemessen werden kann und als Apoptosemarker dient. Gleichzeitig wird die rezeptorvermittelte Phagozytose der Zelle ausgelöst (5). Der K<sup>+</sup>-Ausstrom hyperpolarisiert die Membran, Cl<sup>-</sup> strömt aus und Wasser folgt osmotisch nach, die Zelle schrumpft (6). Die direkte Ca<sup>2+</sup>-ionophore Wirkung von Ionomycin hat dieselben Konsequenzen auf Zellvolumen und Apoptoserate (7). Gleichzeitig wirkt auch die Zellschrumpfung als Aktivator der Scramblase mit anschließender Phosphatidylserinexposition (8).

### 1.4.5 Die Scramblase und der Phosphatidylserin-Flip-Flop

Membranen von Erythrozyten bestehen, wie die aller eukaryoter Zellen, aus einer Lipiddoppelschicht, in der die einzelnen Sphingo- und Phospholipide asymmetrisch verteilt sind. So finden sich im äußeren Blatt vermehrt Sphingomyelin und Phosphatidylcholin, im inneren Blatt dagegen vermehrt Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin [Löffler und Petrides, 1998, S. 176-178; Kol et al., 2002].

Cholesterin, einen weiteren, besonders für die Membranfluidität verantwortlichen Bestandteil, findet man in beiden Blättern in unterschiedlicher Verteilung. Die Asymmetrie der Plasmamembranen spielt eine wichtige Rolle in der Abgrenzung von extra- und intrazellulärem Kompartiment und damit verbundenen Transportvorgängen. Die Zusammensetzung erythrozytärer Membranen ergibt einen Proteinanteil von 49%, einen Kohlenhydratanteil von 8% und einen Lipidanteil von 43% [Löffler und Petrides, 1998, S. 176-178].

Phosphatidylserin ist ein Phosphoglycerid/Phospholipid, bei dem zwei der Hydroxylgruppen des dreiwertigen Alkohols Glycerin mit langkettigen Fettsäuren und die dritte mit Phosphorsäure verestert sind. Der Phosphatrest der Phosphatidsäure ist mit einem weiteren Alkohol, in diesem Fall mit der alkoholischen Gruppe der Aminosäure Serin, verbunden [Löffler und Petrides, 1998, S. 139].

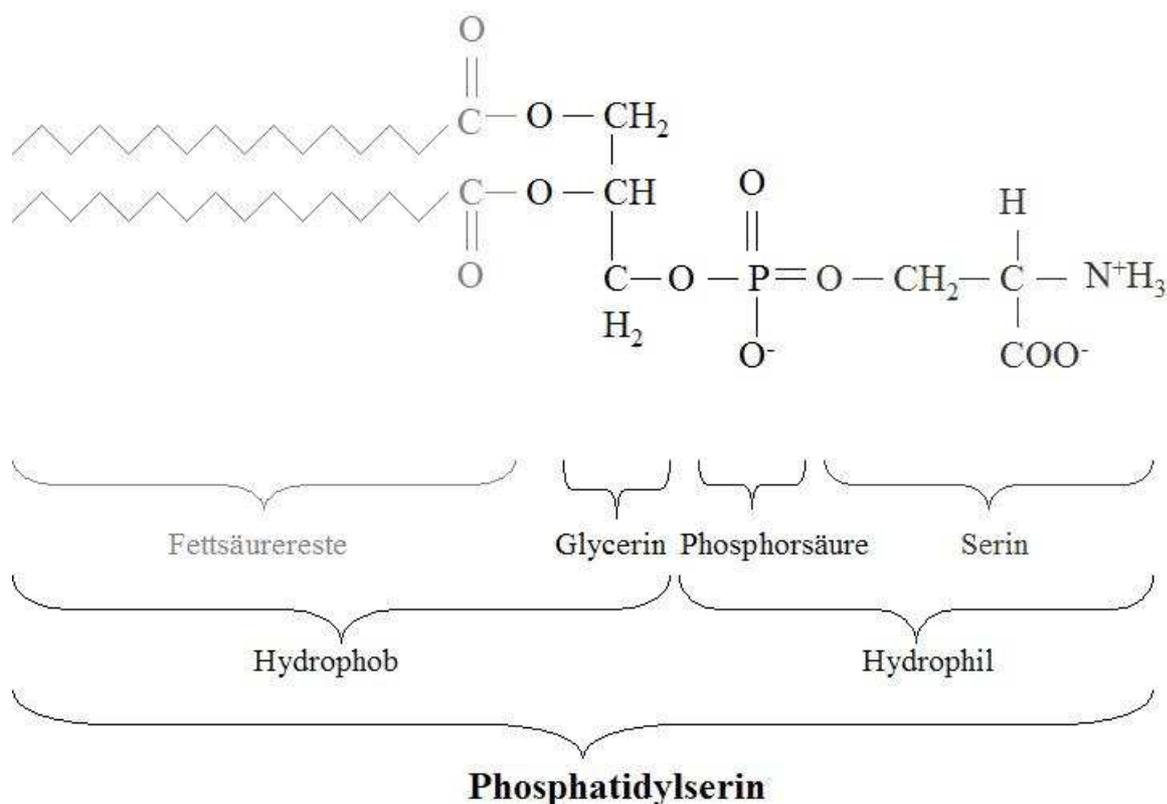


Abb. 8: Aufbau des Phosphatidylserin.

Der hydrophobe Teil des Moleküls wird gebildet von Fettsäureresten, die mit zwei Hydroxylgruppen des Glycerins verestert sind. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins ist wiederum mit Phosphorsäure verestert, die ihrerseits in einer Diesterbindung mit Serin verbunden ist. Phosphorsäure und Aminosäure zusammen bilden den hydrophilen Teil des Phosphatidylserinmoleküls.

Wie bereits besprochen ist ein weiterer wichtiger Indikator für Apoptose der Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite. Dieser wird durch steigende intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, bedingt etwa durch die Behandlung mit Ionomycin, oxidativen Stress, osmotischen Schock oder Chlorid-Depletion in Gang gesetzt [Wolfs et al., 2003; Lang et al., 2003d].

Dieser Verlust der Membranasymmetrie geht auf eine Ca<sup>2+</sup>-bedingte Konformationsänderung eines speziellen Proteins von 37 kDa, der sogenannten Phospholipid-Scramblase, zurück [Dekkers et al., 2002; Kamp et al., 2001; Myssina et al., 2003; Bassé et al., 1996].

Dieses Enzym beeinflusst weitestgehend unselektiv die Verteilung der Phospholipide in der Membran, erhöht jedoch den Phosphatidylseringehalt der Membranaußenseite. Das freie

## 1. Einleitung

intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  hemmt gleichzeitig eine Aminophospholipid Translokase von 120 kDa, die durch eine  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige ATPase-Tätigkeit Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin vom äußeren ins innere Blatt transloziert und damit versucht, die Membranasymmetrie aufrecht zu erhalten.

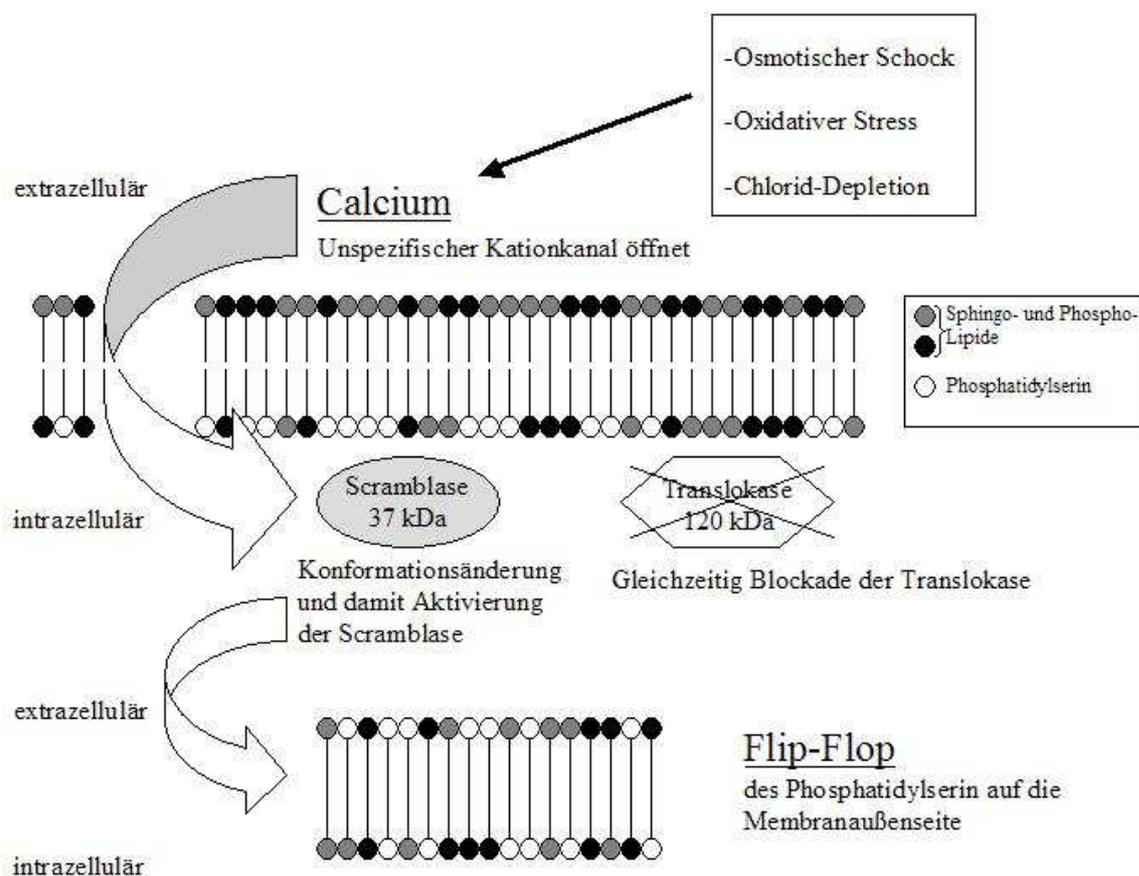


Abb. 9: Schematische Darstellung des Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite.

Öffnet sich der unspezifische Kationkanal auf bestimmte Ereignisse wie oxidativen Stress, Chlorid-Depletion oder osmotischen Schock hin, so kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Dies aktiviert die Scramblase, die nun vermehrt Phosphatidylserin ins äußere Blatt der Membran transloziert. Gleichzeitig wird ein antagonistisch arbeitendes Enzym, die Translokase, blockiert.

Auch aktivierte Zellen translozieren Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite, hierbei kommt es jedoch nicht zu einer gleichzeitigen Hemmung der Aminophospholipid Translokase, wodurch der sich kurzzeitig einstellende Verlust der Membranasymmetrie relativ rasch behoben werden kann [Bassé et al., 1996; Dekkers et al., 2002; Gleiss et al., 2002; Fadok et al., 2001a; Woon et al., 1999].

### 1.4.6 Elimination apoptotischer Zellen durch Makrophagen

Während lebende, intakte Zellen praktisch kein Phosphatidylserin dauerhaft im äußeren Blatt ihrer Plasmamembran tragen, kommt es bei geschädigten, alternden oder apoptotischen Zellen zum sogenannten Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite [Eda und Sherman, 2002; Boas et al., 1998].

Diese Zellen werden sehr rasch, und noch bevor eine inflammatorische Reaktion in Gang kommen kann, von Makrophagen aus dem Organismus entfernt. Hierbei spielen die Veränderungen der Plasmamembran eine bedeutende Rolle, da Makrophagen, Fibroblasten und Epithelien einen spezifischen Rezeptor für Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche tragen, und somit gezielt diejenigen Zellen erkennen und entfernen, die nicht mehr funktionsfähig sind [Fadok et al., 2000; Messmer und Pfeilschifter, 2000].

Die enorme Bedeutung dieses Mechanismus wird dadurch klar, dass Zellen, die kein Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite präsentieren, aber trotzdem geschädigt sind, von Makrophagen nicht erkannt und phagozytiert werden [Fadok et al., 2001b].

Makrophagen sind nicht nur in der Lage, geschädigte Zellen schon vor deren Lyse zu erkennen und somit eine Entzündungsreaktion zu vermeiden, sie können auch gezielt die Freisetzung antiinflammatorisch wirkender Mediatoren bewirken. Hierzu zählen unter anderem TGF- $\beta$ , IL-10 und Prostaglandin E2 [Fadok et al., 2001a].

Darüber hinaus dient diese Veränderung der Membranoberfläche als unterstützender Faktor bei der Blutgerinnung, da Phosphatidylserin Bindungsstellen für das Zusammenfügen der Faktor VIIIaIXa- und VaXa-Enzymkomplexe darstellt [Bassé et al., 1996].

Aufgrund dieser engen Beziehung zwischen Apoptose und dem Erscheinen von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite wird Phosphatidylserin als Apoptosemarker verwendet. Die Apoptoserate von Zellen kann über die Bindung von fluoreszierendem Annexin-V mittels der Durchflusszytometrie am FACS-Gerät gemessen werden [Fadok et al., 2001a].

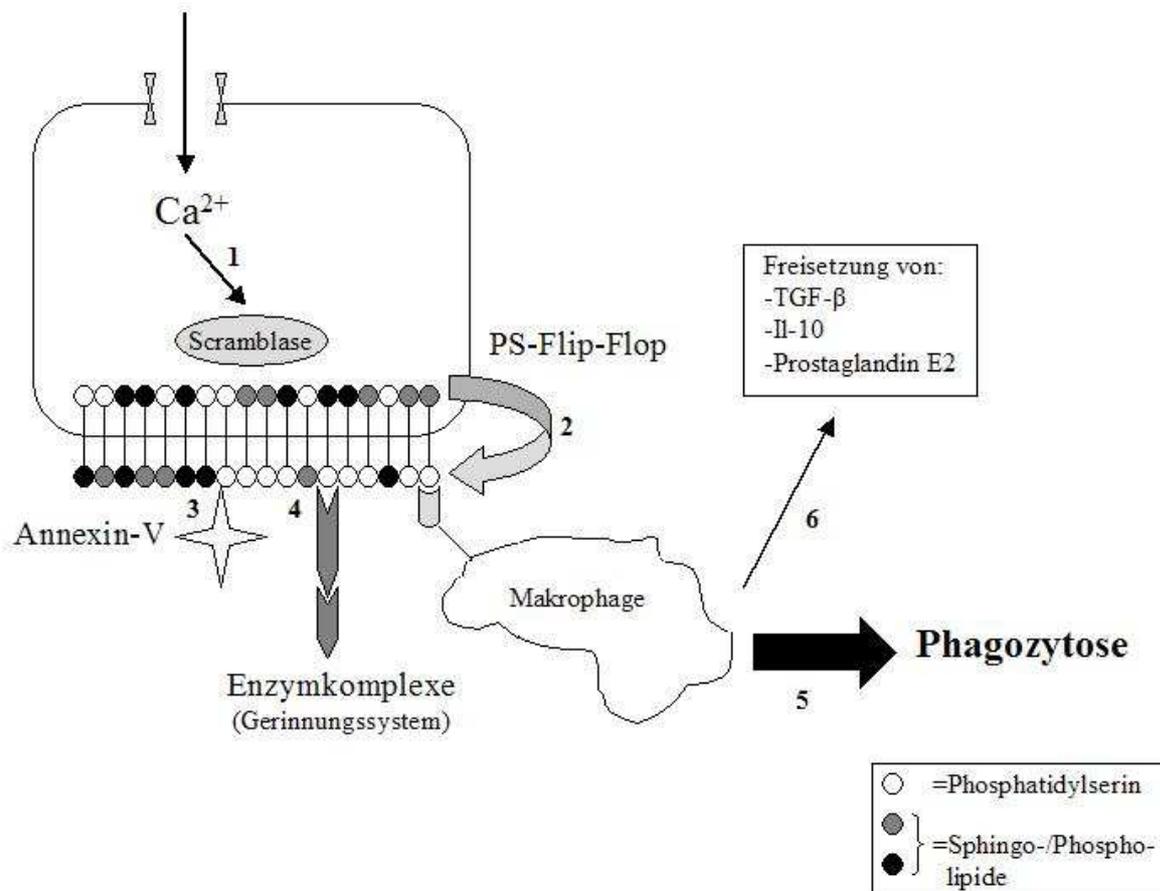


Abb. 10: Konsequenzen des Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite.

Die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Verlauf der Erythrozytenapoptose aktiviert ein membranständiges Enzym, die Scramblase (1). Diese transloziert Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zellmembran (2). Dies zieht verschiedene Konsequenzen nach sich. Zum Einen bindet Annexin-V, ein Fluoreszenzmarker, an das Phosphatidylserin (3). Hierüber kann die Rate der apoptotischen Zellen mittels der Durchflusszytometrie gemessen werden. Zum Anderen stellt das Phosphatidylserin eine Bindungsstelle dar, die das Zusammenfügen verschiedener Enzymkomplexe des Gerinnungssystems ermöglicht und somit auch hier unterstützend wirkt (4). Die bedeutendste Wirkung des Phosphatidylserin-Flip-Flop besteht in der rezeptorvermittelten Aktivierung von Makrophagen, die daraufhin die geschädigte Zelle phagozytieren (5) und gleichzeitig über die Freisetzung verschiedener Mediatoren antiinflammatorisch tätig sind (6).

### 1.5 Fragestellung der Arbeit

Da die Apoptose für viele verschiedene Vorgänge im Organismus eine entscheidende Rolle spielt, gilt es, auslösende Faktoren, Signalwege, Hemmmechanismen und mögliche pharmakologische Interventionsmaßnahmen genauestens zu ergründen.

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Apoptose bei der Embryogenese, der Entstehung von Tumoren, der Elimination autoreaktiver Thymozyten, sowie der Gewebsemauerung durch Phagozytose der geschädigten Zellen ohne Entwicklung von Entzündungszeichen beteiligt. Deshalb bieten sich hier durch die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer Ebene interessante Ansatzpunkte für eine therapeutische Nutzung der die Apoptose modulierenden Faktoren.

Mit dieser Arbeit soll geklärt werden, welche Rolle das Hämolysin Kanagawa für eine mögliche Apoptoseinduktion bei menschlichen Erythrozyten einnimmt. Hierbei sind besonders folgende Punkte interessant:

1. Welcher Art sind, elektrophysiologisch betrachtet, die durch das Hämolysin Kanagawa induzierten Kationströme?
2. Ist das Hämolysin Kanagawa in der Lage, in menschlichen Erythrozyten die Apoptose zu induzieren und inwieweit spielt die bis dato beobachtete Hämolyse von mit Hämolysin Kanagawa behandelten Erythrozyten tatsächlich eine Rolle?
3. Auf welche Weise löst das Hämolysin Kanagawa Apoptose in menschlichen Erythrozyten aus und welcher Signalweg wird hierbei aktiviert?
4. Bestehen Möglichkeiten, modulatorisch in die Signalkaskade einzugreifen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Lösungen und Substanzen

Es wurden nur Erythrozytenkonzentrate gesunder Freiwilliger verwendet, die wir täglich frisch von der Blutbank erhielten.

Alle Experimente wurden bei 37°C durchgeführt, sowohl die Annexin-Färbung als auch die Messungen am Durchflusszytometer erfolgten bei Raumtemperatur.

#### 2.1.1 Standard-Ringer-Lösung

Diese Lösung dient als Grundlage aller Versuche und wird bei bestimmten Fragestellungen, wenn angegeben, entsprechend modifiziert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
HEPES	32 mM
Glucose	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Tab. 1: Zusammensetzung der Standard-Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4, titriert mit NaOH.

HEPES: ist N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure und wird als Puffer (pK<sub>S</sub> 7,4) verwendet.

### 2.1.2 Kalziumfreie Lösung (EGTA)

Da angenommen wird, dass das Hämolyisin Kanagawa seine apoptotische Wirkung über die Induktion eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes entfaltet, dient diese Lösung dazu, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu verhindern und die damit verbundenen Folgen für das Zellvolumen und die Annexin-Bindung abzuschätzen.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
HEPES	32 mM
Glucose	5 mM
EGTA	1 mM

Tab. 2: Zusammensetzung der kalziumfreien Lösung (EGTA) mit einem pH-Wert von 7,4.

EGTA: ist Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N-N-N'-N'-Tetraessigsäure und ist ein für Kalzium spezifischer Chelator.

### 2.1.3 125 mM Kalium-Ringer-Lösung

Diese Lösung wird verwendet, um bei der möglichen Beteiligung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals im Signalweg der durch Hämolyisin Kanagawa induzierten Apoptose durch eine Verringerung des chemischen Gradienten für  $\text{K}^+$  über die Membran dessen Ausstrom zu unterbinden. Besonders die Wirkung auf Zellvolumen und Apoptoserate wird untersucht.

## 2. Material und Methoden

---

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	5 mM
KCl	125 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
HEPES	32 mM
Glucose	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Tab. 3: Zusammensetzung der 125 mM Kalium-Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.4 29 mM Kalium-Ringer-Lösung

s.o.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	101 mM
KCl	29 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
HEPES	32 mM
Glucose	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Tab. 4: Zusammensetzung der 29mM Kalium-Ringer-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.5 Natriumfreie NMDG-Cl-Lösung

Diese Lösung dient dazu, den möglichen Einfluss extrazellulär vorhandener  $\text{Na}^+$ -Ionen auf das Zellvolumen und die Apoptoserate von mit Hämolyisin Kanagawa behandelten Erythrozyten aufzudecken.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NMDG-Cl	125 mM
KCl	5 mM
$\text{MgSO}_4$	1 mM
HEPES	32 mM
Glucose	5 mM
$\text{CaCl}_2$	1 mM

Tab. 5: Zusammensetzung der natriumfreien NMDG-Cl-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4.

NMDG<sup>+</sup>: ist N-Methyl-Glucosamin, ein großes Kation, das intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann.

### 2.1.6 Annexin-Waschpuffer

Diese Lösung wird zum Waschen der Zellen nach dem Inkubieren und vor dem Färben mit Annexin-V-Fluos verwendet.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	125 mM
HEPES	10 mM
$\text{CaCl}_2$	5 mM

Tab. 6: Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.7 Transfusionslösung

Diese Lösung wird für die Hämolysemessung eingesetzt.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
KCN	100 mg/2l
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	400 mg/2l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	280 mg/ml
Extran	10 ml/2l

Tab. 7: Zusammensetzung der Transfusionslösung mit einem pH-Wert von 11,3-11,6.

### 2.1.8 KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung

Diese Lösung wird bei allen Patch-Clamp Versuchen als Pipettenlösung verwendet.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
KCl	80 mM
K-D-Gluconat	60 mM
HEPES/KOH	10 mM
EGTA	1 mM
Mg-ATP	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

Tab. 8: Zusammensetzung der KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung mit einem pH-Wert von 7,2.

### 2.1.9 NaCl-Standardspüllösung

Bei allen Patch-Clamp Versuchen dient dieses Medium als Standardlösung und wird, wenn angegeben, entsprechend verändert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	125 mM
HEPES/NaOH	32 mM
KCl	5 mM
5-D-Glucose	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Tab. 9: Zusammensetzung der NaCl-Standardspüllösung mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.10 Natriumfreie NMDG-Cl-Spüllösung

Mit dieser Lösung wird bei den Patch-Clamp Experimenten ein möglicher Na<sup>+</sup>-Einstrom verhindert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NMDG-Cl	160 mM
HEPES/NMDG	10 mM

Tab. 10: Zusammensetzung der natriumfreien NMDG-Cl-Spüllösung mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.11 Kalziumfreie EGTA-Spüllösung

Diese Lösung dient bei den Patch-Clamp Versuchen dazu, die Folgen eines verhinderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms auf die gemessenen Ströme zu bestimmen.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	125 mM
HEPES/NaOH	32 mM
KCl	5 mM
5-D-Glucose	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	0,5 mM

Tab. 11: Zusammensetzung der kalziumfreien EGTA-Spüllösung mit einem pH-Wert von 7,4.

### 2.1.12 Hochkalziumhaltige CaCl<sub>2</sub>-Spüllösung

Die Verwendung dieser Lösung bei den Patch-Clamp Versuchen soll einen eventuellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verdeutlichen.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
CaCl <sub>2</sub>	100 mM
HEPES/Ca(OH) <sub>2</sub>	10 mM

Tab. 12: Zusammensetzung der hochkalziumhaltigen CaCl<sub>2</sub>-Spüllösung mit einem pH-Wert von 7,4.

## 2.2 Weitere Substanzen und deren Hersteller

Substanz	Konzentration	Hersteller
Hämolysin Kanagawa von <i>V. parahaemolyticus</i>	0,01; 0,1; 0,25 oder 0,5 U/ml	Sigma-Aldrich, München, D
Clotrimazol	5 µg/ml	Sigma, München, D
Valinomycin	1 µM	Sigma, München, D
Ionomycin	1 µM	Sigma, München, D
Annexin-V-Fluos	Verdünnung 1:100	Roche, Mannheim, D

Tab. 13: Weitere verwendete Substanzen, deren Konzentrationen und Hersteller.

**Clotrimazol:** ist ein Imidazolpräparat, das in der Dermatologie als Antimykotikum lokal eingesetzt wird. Hier hemmt es die Ergosterolsynthese in der Pilzmembran durch die Blockade Cytochrom P<sub>450</sub>-abhängiger Enzyme und wirkt somit fungistatisch im Sinne einer Wachstumshemmung.

In dieser Arbeit wird es als spezifischer Hemmstoff des K<sup>+</sup>-Ausstroms durch den Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Gardos-Kanal in Erythrozytenmembranen verwendet.

**Ionomycin:** ist ein Ca<sup>2+</sup>-Ionophor, bindet das Calcium im Komplex 1:1 und transportiert es durch biologische Membranen. Es ist ein Antibiotikum, das aus *Streptomyces conglobatus* isoliert wurde. In dieser Arbeit sollen hiermit die Konsequenzen eines induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in die Erythrozyten aufgezeigt werden.

**Valinomycin:** wird von *Streptomyces fulvissimus* gebildet und ist ein Ionophor-Antibiotikum. Es transportiert einwertige Ionen (Rb > K >> NH<sub>4</sub> > Na > Li) ohne einen Kanal zu bilden durch biologische Membranen. Zweiwertige Ionen werden kaum komplexiert. Dabei besitzt es eine hohe Selektivität für Kalium gegenüber Natrium (K<sup>+</sup> : Na<sup>+</sup> entspricht 10000) und beeinflusst nicht die Permeabilität für andere Ionen. In dieser Arbeit wird es zur Bestimmung des maximal möglichen K<sup>+</sup>-Ausstroms aus Erythrozyten verwendet.

Sämtliche Lösungen wurden gekühlt und, insbesondere die Transfusionslösung, im Dunkeln zur Vermeidung einer mikrobiellen Besiedelung und eventueller lichtbedingter Schäden gelagert und regelmäßig frisch angesetzt.

Alle Substanzen wurden nach den Angaben der Hersteller als Stammlösungen angesetzt und entsprechend gelagert und verarbeitet. Bei den in DMSO als Lösungsmittel angesetzten Substanzen lag die Endkonzentration des Dimethylsulfoxid unter 0,2% und hatte deshalb keine Auswirkungen auf die Erythrozyten.

### 2.3 Sonstige Verbrauchsgüter

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Laborfilm	Parafilm, American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen	Carl Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße	Carl Roth, Karlsruhe, D
Messröhrchen für FACSCalibur	Falcon Polystyrol, Becton-Dickinson, Heidelberg, D

Tab. 14: Sonstige Verbrauchsgüter und deren Hersteller.

### 2.4 Versuchsansätze und Zellsuspensionen

Die Versuchsansätze wurden bei Raumtemperatur unter der sterilen Werkbank vorgenommen. Es wurden 3 µl des Erythrozytenkonzentrats zu 1 ml der jeweils verwendeten Lösung gegeben, hierauf erfolgte der Zusatz anderer wirksamer Substanzen in den angegebenen Konzentration.

Anschließend wurden die Zellen bei 37°C entsprechend inkubiert (Inkubator von Heraeus) und danach mit Annexin-V-Fluos gefärbt.

### 2.5 Annexin-Färbung mit Annexin-V-Fluos

Eine Veränderung apoptotischer Zellen ist das Exponieren von Phosphatidylserin, das normalerweise nur im inneren Blatt der Zellmembran vorkommt, auf die Außenseite der Zelle. Dies macht man sich bei der Färbung mit Annexin-V zu nutze.

Annexin-V ist ein Mitglied einer Familie von Proteinen, den sogenannten Annexinen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an negativ geladene Phospholipidoberflächen binden können, wobei gerade beim Annexin-V die hohe Spezifität für Phosphatidylserin im Vordergrund steht. Es konnte 1985 zum ersten Mal isoliert werden und erhielt aufgrund seiner gerinnungshemmenden Wirkung, die sowohl auf einer Verdrängung verschiedener koagulierend wirkender Faktoren von der Plasmamembran als auch auf einer Hemmung der Prothrombinase beruht, die Bezeichnung VAC alpha (vascular anticoagulant alpha) [Andree et al., 1990; 1992].

Andere Bezeichnungen für dieses Protein sind placental anticoagulant protein I, Endonexin II, Lipocortin V, placental protein 4 und Anchorin CII. Dies weist auf die vielfältigen Funktionen des Proteins im Organismus hin, und man weiß mittlerweile, dass es an entzündlichen Prozessen, der Blutgerinnung, der Regulation der Phospholipase A<sub>2</sub>, Exozytose und der Regulation der Interaktionen zwischen Membran und Zytoskelett beteiligt ist [Rothhut et al., 1989; Schlaepfer et al., 1987; Tait et al., 1991].

Sein Molekulargewicht wird in neuesten Veröffentlichungen mit 35 kDa angegeben [Poghosyan et al., 2003].

## 2. Material und Methoden

---

Das in dieser Arbeit zur Färbung verwendete rekombinante Annexin-V wird von Escherichia Coli (Linie NB42) produziert. Annexin-V-Fluos sind FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugiertes Annexin-V, deren Absorptionsspektrum bei 450-500 nm (Maximum bei 495 nm) und deren Emissionsspektrum bei 515-565 nm (Maximum bei 525 nm) liegt und vom Zytometer auf FL1 als grüne Fluoreszenz gemessen wird.

Es wurden nach Angaben des Herstellers regelmäßig frische Aliquots zu je 20 µl Annexin-V-Fluos in 1 ml Waschpuffer verdünnt hergestellt und ebenfalls nach Angaben des Herstellers bei -15 bis -25°C bis zur Verwendung im Dunkeln gelagert. Ein mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Aliquots ist vermieden worden.

Zur Färbung wurden 100µl der Zellsuspension in 1 ml Waschpuffer verdünnt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall RT 6000 B). Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Annexin-V-Fluos Färbelösung auf dem Vortexrührer (Carl Roth, Karlsruhe, D) resuspendiert und nun für 10-15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Stoppen des Färbvorganges wurden 400 µl Waschpuffer zugegeben und die Messung mit dem Durchflusszytometer konnte durchgeführt werden.

Da man festgestellt hat, dass Annexin auch bei nekrotischen Zellen von innen her an das Phosphatidylserin binden und damit Apoptose vortäuschen kann, erfolgt bei kernhaltigen Zellen eine gleichzeitige Färbung mit Propidiumjodid. Dies bindet nur bei nekrotischen Zellen, deren Membranen porös geworden sind, im Zellinneren an die DNA.

Leider enthalten Erythrozyten keine DNA mehr, so dass eine Gegenfärbung nicht apoptotischer, sondern nekrotischer Zellen nicht erfolgen kann. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Annexin-V bei Bindung an Vesikel zweidimensionale Cluster bildet [Andree et al., 1992].

Da die Masse eines Moleküls Annexin-V mit 35 kDa bereits mehr als die Hälfte der Masse des Hämoglobinmoleküls beträgt, nimmt man an, dass das auf der Membranoberfläche geclusterte Annexin-V nicht in die Zelle eindringen und diese somit fälschlicherweise von innen anfärben kann, solange es noch nicht zu einem Ausstrom des Hämoglobins und damit deutlicher Hämolyse gekommen ist.

### 2.6 Durchflusszytometrie

Dieses Verfahren, auch FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) genannt, dient der Unterscheidung von einzelnen Zellen oder anderen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom aufgrund verschiedener Lichtstreuungseigenschaften und der emittierten Fluoreszenzstrahlung.

Sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Proteine können quantitativ erfasst werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper spezifisch an Zellstrukturen binden und im FACS-Gerät durch einen Laserstrahl zur Lichtemission angeregt werden. Die Grundlagen für dieses Prinzip der Zellseparation wurden 1949 von Wallace Coulter, der ein Patent zur Zellzählung von gelösten Partikeln beantragte, gelegt. Einige Jahre später folgte die bedeutende Entdeckung der hydrodynamischen Fokussierung, die bis heute die Basis der Zytometer bildet.

Die Zellsuspension mit den Fluoreszenzfarbstoff-gefärbten Zellen wird mittels Pressluft durch eine Kapillare in eine Probenkammer gepresst. Dies ist der sogenannte Probenstrom. Schon in der Kapillare sorgt der sogenannte Hüllstrom (aus entgastem Wasser, auch „Sheath“) für eine laminare Strömung, die wiederum dafür sorgt, dass die Zellen einzeln hintereinander, perlschnurartig aufgereiht, den Laserstrahl kreuzen. Erreicht wird dies durch den höheren Druck des Hüllstroms, der den Probenstrom fadendartig auszieht. Man spricht hierbei auch von hydrodynamischer Fokussierung, wobei jede Zelle in der Probenkammer einzeln den Laserstrahl rechtwinklig passiert.

Die Geschwindigkeit, mit der die Zellen vermessen werden, sollte nicht über 2000 Ereignissen pro Sekunde liegen, da über dieser Grenze zwar mehrere Zellen beleuchtet werden, vom Computer jedoch unter Umständen als ein einziges Messereignis interpretiert und registriert werden können.

Trifft der Laserstrahl, meist ein Argonionenlaser, der monochromatisches, kohärentes Licht liefert, auf die markierten Zellen, so hat dies verschiedene Auswirkungen. Zum Einen kommt es zu einer Streuung des Lichts in Richtung des Strahls. Hierbei spricht man vom sogenannten Vorwärtsstreulicht, Engwinkelstreulicht, oder auch dem forward scatter (FSC), das ein relatives Maß für die Zellgröße und den Brechungsindex darstellt und über Photodioden gemessen wird.

## 2. Material und Methoden

---

Zum Anderen kommt es zu einer Streuung des Lichts orthogonal zum einfallenden Lichtstrahl. Dies ist das sogenannte Seitwärtsstreulicht oder side scatter (SSC), das Rückschlüsse auf die Granularität und Membranfaltung der Zellen zulässt und wegen der geringen Lichtmengen von Photomultiplerröhren aufgefangen wird.

Der Laserstrahl bewirkt natürlich auch eine Emission von Fluoreszenzlicht der markierten Antikörper. Dies beruht darauf, dass ein Fluorochrom die Lichtenergie des auftreffenden Laserstrahls absorbiert und seine Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Hinter dem Laserpuls fallen die Elektronen wieder auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück, was sich in der Emission von Photonen, also Licht, bemerkbar macht. Das freiwerdende Licht ist jeweils spezifisch für ein bestimmtes Fluorochrom und wird von einem Photonendetektor, der sogenannten Photomultiplerröhre, (PMT = photomultiplier tube), gemessen. Die freiwerdende Energie ist dabei immer etwas geringer als die absorbierte Energie und proportional zur Menge an pro Zelle gebundenen Antikörpern.

Durch die Verwendung verschiedener Fluorochrome mit jeweils anderem Emissions-, aber gleichem Absorptionsspektrum, kann eine einzige Lichtquelle, aber unterschiedliche Farbstoffe zur Färbung verschiedenster Zellelemente, verwendet werden. Das Fluoreszenzlicht muss hierbei durch zwischengeschaltete dichrote Teilerspiegel und Bandpassfilter nach Wellenlängen aufgetrennt werden, bevor es die Lichtsensoren erreicht. Je schmalbandiger ein Filter ist, desto geringer wird die Überlappung der Fluoreszenzspektren, aber leider auch die wahrnehmbare Fluoreszenzausbeute.

<b>Fluorochrom</b>	<b>Absorption [nm]</b>	<b>Emission [nm]</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Fluoreszenz</b>
Fluoresceiniso-thiocyanat	495	525	FITC	FL1: grün
R-Phycoerythrin	488, 565	578	PE	FL2: orange
R-Phycoerythrin-Cyanin-5	488, 565, 652	674	PE-Cy5	FL3: tief-rot

Tab. 15: Einige wichtige Fluorochrome in der Durchflusszytometrie.

Da die Detektoren nicht kontinuierlich arbeiten und nur die Signale einzelner Zellen erfassen, erfolgt die Auslösung einer Messung über einen Schrittmacher-Impuls, oftmals den forward

scatter, also über die Größe eines Partikels. Der Schwellenwert, über dem eine Messung gestartet wird, nennt man „trigger“.

Treffen die emittierten Photonen auf die Hochspannungsfelder der PMTs, so werden sie in Ströme und dann in Spannungsimpulse umgewandelt, die verstärkt und dann in Form digitaler Signale vom Computer verarbeitet werden. Die PMTs arbeiten zwischen 200 und 850 Volt, die Messsignale werden von Analog-zu-Digital-Konvertern entsprechend ihrer Intensität in 256, 1024 oder 4096 Kanäle eingeteilt [Longobardi-Givan 1992; Raffael et al., 1994; Nebe 1996; Shapiro, 2003].

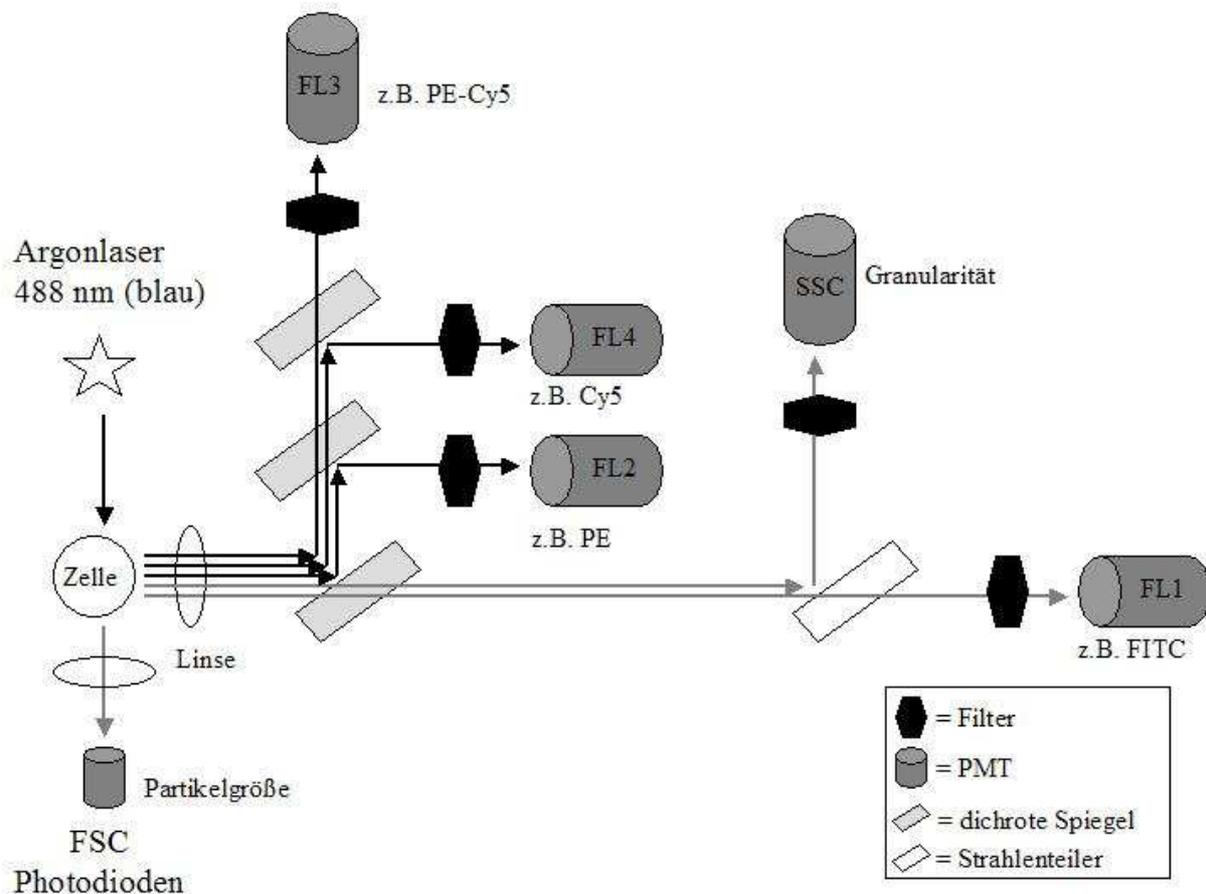


Abb. 11: Schematische Darstellung der Messanordnung im Inneren eines FACS-Gerätes.

Das nach dem Auftreffen des Laserstrahl auf den Erythrozyten in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird über Photodioden als forward scatter (FSC) gemessen. Im Winkel von 90° gestreutes Licht wird als side scatter (SSC) erfasst. Die Aufteilung des gestreuten Lichts erfolgt über Strahlenteiler und dichrote Teilerspiegel. Die Fluoreszenzstrahlung wird entsprechend ihres Emissionsspektrums über verschiedene Photomultiplieröhren detektiert. So strahlt das in dieser Arbeit verwendete FITC-konjugierte Annexin-V in FL1 ein.

Das für diese Arbeit verwendete Zytometer ist ein FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland), das mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm ausgestattet ist und eine Analyse von bis zu drei Farben gleichzeitig zulässt. Wir haben hiermit die Fluoreszenz des FITC-konjugierten Annexin-V auf FL1, die Zellgröße und damit das Zellvolumen über den forward scatter und die Granularität der Erythrozyten über den side scatter gemessen.

Die für die Wartung und den Betrieb des FACS-Gerätes benötigten Lösungen (FACSRinse, FACSClean, FACSFlow, alle Becton-Dickinson) wurden stets frisch verwendet und regelmäßig gewechselt.

Die Datenaufnahme und die Weiterverarbeitung erfolgte am Macintosh Rechner (7600/132 bzw. iMac) über das Programm CellQuest, Version 3.01f (Becton-Dickinson).

Für die Darstellung wählten wir die Histogramm-Plot-Darstellung, aus der entweder die Größenverteilung mittels des forward scatter oder die Verteilung Annexin-positiver Zellen über FL1 zu ersehen ist.

Für die Tabellenkalkulation und die Erstellung der Diagramme wurde das Programm „Excel“ (Microsoft, Unterschleissheim, D) verwendet.

### **2.7 K<sup>+</sup>-Verlust bestimmt durch Flammenemissionsphotometrie**

Der Verlust an intrazellulärem Kalium wird über den Anstieg des Kaliumgehaltes im Überstand nach Abzentrifugation mittels der Flammenemissionsphotometrie bestimmt.

Dieses Verfahren dient der quantitativen Bestimmung von Alkali- (Na, K, Li) und Erdalkalimetallen (Ca, Mg). Hierbei werden Atome, die in der Flamme erhitzt werden, für kurze Zeit in einen energiereicheren Zustand versetzt, indem ihre Elektronen in weiter außen gelegene Schalen gebracht werden. Kehren die Elektronen in ihren energieärmeren Zustand zurück, so wird der größte Teil der vorher absorbierten Energie in Form von Licht als Emissionsenergie abgegeben. Die Wellenlänge und somit die Farbe des freiwerdenden Lichts sind charakteristisch für das jeweilige Metall. So sendet Natrium Licht der Wellenlänge 589

nm (gelb), Kalium Licht der Wellenlänge 768 nm (pink) und Kalzium Licht der Wellenlänge 620-622 (ziegelrot) aus. Barium erscheint braun-grün, Lithium und Strontium erscheinen rötlich.

Die zu messende Probe wird über ein Ansaugrohr in den Zerstäuber gebracht und von diesem in die Flamme geleitet. Bei der Flamme handelt es sich für Erdalkalimetalle um eine Acetylenpressluftflamme von 2300°C, für Alkalimetalle um eine Propanpressluftflamme von 1900°C. Die Atome werden angeregt und senden ihr spezifisches Licht aus, was zu einer Verfärbung der Flamme führt. Mit einem Monochromator wird genau die Wellenlänge des emittierten Lichts desjenigen Metalls eingestellt, das man messen möchte. Für die Kaliummessung wird der Monochromator auf 768 nm eingestellt, es wird nun nur noch genau das Licht dieser Wellenlänge durchgelassen. Ein Detektor misst die Intensität dieses Lichts, die der Konzentration des Kaliums in der Probe entspricht.

Neue Photometer besitzen eine sogenannte Lithiumleitlinie als relatives Bezugssystem für die Messung anderer Parameter (wie etwa Na, K, Ca) um Unregelmäßigkeiten in der Flamme auszugleichen. Deswegen ist in der Verdünnungslösung des Photometers eine gewisse Menge Lithium vorhanden.

Die Ergebnisse der Kaliummessung im Überstand wurden in Bezug gesetzt zum maximal möglichen Kaliumverlust der Zelle nach der Behandlung mit dem Kalium-Ionophor Valinomycin in einer Konzentration von 1 µm.

## **2.8 Bestimmung der Hämolyse mittels photometrischer Hb-Messung**

### **2.8.1 Hämoglobin**

Erythrozyten, deren Membranpermeabilität für Ionen wie z.B. Na<sup>+</sup> gesteigert wird, können den Na<sup>+</sup>-Einstrom nicht mehr durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase kompensieren. Es kommt zu einer Zellschwellung und damit zum Platzen der Zellen, wobei ihr Inhalt, hauptsächlich das Chromoprotein Hämoglobin, freigesetzt wird.

Hämoglobin ist ein tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von 64 kDa, bei dem jede Untereinheit aus einer Proteinkette, dem sogenannten Globin, und einem Eisenporphyrinsystem, dem sogenannten Häm, zusammengesetzt ist.

Der Hämoglobingehalt eines Erythrozyten liegt zwischen 26 und 35 pg, der Hämoglobingehalt des Gesamtblutes liegt im Mittel bei 15,5 g/dl für Männer und 14 g/dl für Frauen. [Schmidt et al., 2000, S. 604-608]

Die verschiedenen Hämoglobinformen unterscheiden sich in ihren Proteinanteilen. So setzt sich das Hämoglobin des Erwachsenen (95% HbA) aus jeweils zwei  $\alpha$ - (141 Aminosäuren) und zwei  $\beta$ -Ketten (146 Aminosäuren) zusammen. Fetales Hämoglobin (HbF) setzt sich aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\gamma$ -Ketten zusammen.

Die vier prosthetischen Gruppen des Hämoglobin sind Protoporphyrine mit zentralem zweiwertigem Eisenatom. Sie verleihen durch ihre spektralen Eigenschaften dem Hämoglobin die typische rote Farbe. Jeder Protoporphyrinring setzt sich seinerseits aus vier über Methinbrücken verbundenen Pyrrolringen zusammen. Sauerstoff bindet an das zentrale Eisen, ohne dessen Wertigkeit zu verändern. Man spricht nun von oxygeniertem Hämoglobin (HbO<sub>2</sub>). Hämoglobin, das seinen Sauerstoff abgegeben hat, wird als Desoxyhämoglobin (Hb) bezeichnet.

Diese Bindungsstelle für Sauerstoff geht verloren, wenn das Eisenion spontan zu dreiwertigem Eisen oxidiert wird und somit Methämoglobin entsteht. Ein Enzym, die Methämoglobinreduktase, verhindert ein Überhandnehmen des Methämoglobinanteils im Blut, indem es mit NADH als Reduktionsmittel das Met-Hb zu Hb reduziert.

Die rote Farbe des Hämoglobins ergibt sich dadurch, dass die kurzwellige Strahlung des Blaubereichs besonders gut absorbiert wird, während das langwellige Licht des Rotbereichs gut durchgelassen wird. Oxygeniertes Hämoglobin absorbiert besonders gut im Bereich von 577 nm und 541 nm. Desoxygeniertes Hämoglobin absorbiert bei 555 nm und erscheint dem Auge bläulicher.

### 2.8.2 Absorptionsphotometrie

Fallen Lichtstrahlen durch die Lösung eines Stoffes, so werden von diesem bestimmte Wellenlängenbereiche absorbiert. Die Wellenlängen, die ein Stoff absorbiert, entscheiden über seine Farbe. Welche Wellenlängen absorbiert werden, hängt vom Energieniveau der Bindungselektronen des gelösten Moleküls ab. Somit ergibt sich ein für diese Substanz spezifisches Absorptionsspektrum.

Die Absorption bei der Durchstrahlung einer Lösung im Photometer äußert sich dadurch, dass diese Wellenlängen in höherem Maß geschwächt werden als andere. Diese Schwächung ist nun direkt von der Konzentration des gelösten Stoffes abhängig, was eine Berechnung der Stoffmenge in der Lösung über das Maß der Schwächung der Lichtintensität bei einer bestimmten Wellenlänge ermöglicht.

Hierzu wird das Lambert-Beer'sche Gesetz benötigt, das als Maß für die Absorption die sogenannte Extinktion verwendet und damit die Konzentration des Stoffes berechnen lässt:

$$E = \log(I_e/I_a) = e * c * d$$

Gl. 2: Lambert-Beer'sches Gesetz.

$e$  = Extinktionskoeffizient (Stoffkonstante)

$c$  = Konzentration des Stoffes [mmol/l]

$E$  = Extinktion

$d$  = Schichtdicke [mm]

$I_e$  = Intensität des eintretenden Lichts

$I_a$  = Intensität des austretenden Lichts

Dieses Gesetz gilt nur bei der Durchstrahlung mit monochromatischem Licht, d.h. Licht einer einzigen Wellenlänge.

Die quantitative Bestimmung von Hämoglobin in einer wässrigen Lösung erfolgt nach Umwandlung von Hämoglobin in das sogenannte Cyanmethämoglobin (HbCN). Dieses ist wesentlich farbstabiler, da durch die Oxidation von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen die Bindungsmöglichkeit für Luftsauerstoff verloren geht und das Hämoglobin somit keine spontane Konformationsänderung durchführen kann. Cyanmethämoglobin besitzt ein charakteristisches Spektrum und absorbiert besonders gut bei einer Wellenlänge von 546 nm. Für die Umwandlung des Hämoglobins zu Cyanmethämoglobin wird Kaliumferrizyanid  $K_3[Fe(CN)_6]$ , Kaliumzyanid KCN und Kaliumdihydrogenphosphat  $KH_2PO_4$  verwendet.

Im Photometer wird nun die Extinktion bei der Durchstrahlung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 546 nm gemessen und bei bekannter Schichtdicke der Küvette und bekanntem Extinktionskoeffizienten des Cyanmethämoglobins die Konzentration des gesuchten Stoffes nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

Für diese Arbeit wurde zur Quantifizierung der stattgefundenen Hämolyse eben dieses Verfahren verwendet, bei dem das im Überstand befindliche Hämoglobin mittels der Absorptionsphotometrie bestimmt wurde und dann als direktes Maß der Hämolyse gewertet werden konnte. Die Ergebnisse wurden in Bezug zum maximal möglichen Hämoglobinverlust (100%) der Zelle nach deren kompletter Lyse gesetzt.

Die Messung der kompletten Lyse der Erythrozyten als Vergleichswert erfolgte, indem 50 µl eines Hämolysin-freien Ansatzes in 700 µl Transfusionslösung gegeben wurde. In 200 µl dieser Lösung erfolgte nun die Messung der Extinktion und damit des 100%-Wertes.

Für die Bestimmung der Werte aus den Hämolysin-haltigen Ansätzen wurde zuerst abzentrifugiert, danach 50 µl des Überstandes in 700 µl Transfusionslösung gegeben und hiervon in 200 µl die Extinktion bestimmt.

### **2.9 Patch-clamp**

Dieses Verfahren zur Messung von Strömen durch einzelne Kanalmoleküle wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt, die dafür 1991 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten.

Es kann als Weiterentwicklung des Voltage-clamp-Verfahrens angesehen werden, bei dem das Membranpotential auf einen festen Wert geklemmt wird, so dass der messbare Strom allein durch Ionenströme durch den untersuchten Kanal verursacht wird. [Aidley und Stanfield, 1996

Es wird eine mechanisch feste Verbindung zwischen einer feinen, hitzepolierten Glasmikropipette mit einem Pipettenspitzendurchmesser von 1 µm und der Zellmembran hergestellt. Durch das Anlegen eines Unterdrucks und damit dem Ansaugen der Membran an

die Pipettenspitze wird eine Dichtung, ein sogenanntes „seal“, mit einem Widerstand von über  $1\text{ G}\Omega$  zwischen dem Pipetteninneren und dem Außenmedium geschaffen. Auf diese Weise wird der in der Pipettenspitze befindliche Membranfleck und damit die hier sitzenden Kanäle elektrisch vom Rest der Zellmembran isoliert. Wichtig ist hierbei, dass die Pipette staubfrei und die Zellmembran nicht mehr durch Bindegewebeanteile bedeckt ist, da sich nur unter einwandfreien Bedingungen die gewünschte elektrische Isolierung einstellen kann.

Im Inneren der Glaspipette befindet sich eine Salzlösung, in dieser Arbeit als Pipettenlösung bezeichnet, deren Zusammensetzung in etwa dem extrazellulären Milieu entspricht, und eine darin angeschlossene Messelektrode. Diese entspricht dem sogenannten „Klemmverstärker“, der die Spannung in der Pipette auf eine gewählte „Sollspannung“ einstellt und den Strom durch die Kanäle der Plasmamembran misst.

Wird ein Membranstrom registriert, so muss von der Messapparatur ein Kompensationsstrom mit gleicher Amplitude wie der Membranstrom, aber mit entgegengesetzter Polarität zum Ausgleich der Spannung produziert werden. Ausgehend vom benötigten Kompensationsstrom kann auf den Membranstrom durch den untersuchten Kanal geschlossen werden.

Solche Untersuchungen werden auf einem Mikroskop durchgeführt, damit einzelne Zellen sichtbar gemacht werden können. Zur Positionierung der Messelektroden werden Mikromanipulatoren benötigt, die die Pipettenspitze mikrometergenau führen können.

Verschiedene Verfahren zur Messung einzelner Kanalströme stehen zur Verfügung. So spricht man bei auf die Membran aufgesetzter Glaspipette von der sogenannten on-cell oder cell-attached Konfiguration.

Wird nun die Pipettenspitze zurückgezogen, bleibt aufgrund der enormen Stabilität des „Seal“ die Ableitungskonfiguration erhalten, und es können die Lösungen auf der Innen- und Außenseite der Membran experimentell kontrolliert werden. Man spricht hierbei von der sogenannten „inside-out-Konfiguration“.

Wird das in der Pipettenspitze befindliche Membranstück durch Anlegen eines Sogs aus der restlichen Zellmembran herausgelöst, so erhält man Zugang zum Inneren der Zelle, das mit Pipettenlösung gefüllt werden kann, womit das Ableiten von Strömen über der gesamten Plasmamembran und somit die elektrophysiologische Untersuchung der Zelle insgesamt ermöglicht wird. Dies ist die sogenannte „whole-cell-Konfiguration“.

Zieht man nun die Pipettenspitze zurück, so verschließt sich die Membran, wobei die zytoplasmatische Seite dem Pipetteninneren zugekehrt ist. Bei dieser „outside-out-

Konfiguration“ können die Auswirkungen exogener Stoffe auf die Kanalströme untersucht werden.

Wir verwendeten für unsere Experimente, die bei Raumtemperatur mit frisch gewonnenen menschlichen Erythrozyten durchgeführt wurden, Glasmikroelektroden (Borosilikatglaskapillaren, Typ 150 TF-10, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, GB) mit einem Gesamtwiderstand zwischen 9 und 15 Megaohm. Die Versuche wurden in der „cell-attached/on-cell-“ und „whole-cell-Konfiguration“ durchgeführt.

Die Ströme wurden bei einer Stichprobenrate von 10 kHz mittels eines EPC-9 Verstärkers (Heka, Lambrecht, Deutschland) unter Verwendung der Software Pules (Heka, Lambrecht, Deutschland) und einer ITC-16 Schnittstelle (Instrutech, Port Washington, NY, USA) gemessen und bei 3 kHz low pass gefiltert.

Für die „whole-cell-Konfiguration“ wurde das Haltepotential auf  $-30$  mV geklemmt.

Die Ströme in der „whole-cell-“ und „cell-attached-Konfiguration“ wurden mittels 400 oder 700 square pulses auf Spannungen zwischen  $-100$  und  $+80$  mV ( $20$  mV Zuwachs) ausgelöst.

Die Datenanalyse erfolgte durch das Mitteln der Ströme zwischen  $100$  und  $350$  ms ( $400$  ms Impuls) oder zwischen  $200$  und  $650$  ms ( $700$  ms Impuls).

Die angelegten Spannungen gelten für die zytoplasmatische Seite der Membran, bezogen auf das extrazelluläre Medium.

Verbindungspotentiale im flüssigen Milieu zwischen Bade- und Pipettenlösung sowie zwischen Badelösung und der Salzbrücke wurden berechnet und die ermittelten Daten nach Barry und Lynch korrigiert [Barry und Lynch, 1991].

Die Einwärtsströme, definiert als Fluss positiver Ladung von der Pipette in der „cell-attached-Konfiguration“ beziehungsweise dem Bad in der „whole-cell-Konfiguration“ ins Zellinnere hinein, sind negative Ströme und werden als Ablenkung der ursprünglichen Stromkurve nach unten dargestellt.

Die Stromkurven werden nach einer  $500$  Hz low-pass Filterung dargestellt; die Ströme der individuellen square pulse sind darübergerlegt.

### **2.10 Auswertung und Statistik**

Die gemessenen Werte wurden als arithmetisches Mittel (mean) +/- dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error of the mean) angegeben. Die Zahl der voneinander unabhängigen Messungen wurde als n bezeichnet. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test, dem Welch-t-Test, dem Anova-Test oder dem repeated measures ANOVA with post-test, wobei nur Werte mit  $P \leq 0,05$  als signifikant angesehen wurden.

### **3 Versuche und Ergebnisse**

#### **3.1 Zellvolumenmessungen anhand der forward scatter Bestimmung am FACS-Gerät**

##### **3.1.1 Durch Hämolysin Kanagawa induzierte Schrumpfung der Erythrozyten, gemessen mittels des Durchflusszytometers**

Für diesen Versuch wurden Ansätze in Standard-Ringer-Lösung, Standard-Ringer-Lösung mit zugesetztem 5  $\mu\text{M}$  Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol und in kalziumfreier Lösung vorgenommen. Die Erythrozyten wurden dann mit 1 U/ml Hämolysin Kanagawa für 4 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend erfolgte die Messung des Zellvolumens anhand des forward scatter im FACS-Gerät.

Des weiteren wurde, um die Auswirkungen einer länger andauernden Hämolysinexposition auf die Erythrozyten aufzuzeigen, das Zellvolumen nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen des Hämolysins (0 U/ml, 0,01 U/ml, 0,1 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml) mit anschließender 30minütiger bzw. 10stündiger Inkubation bei 37°C bestimmt.

### 3. Versuche und Ergebnisse

---

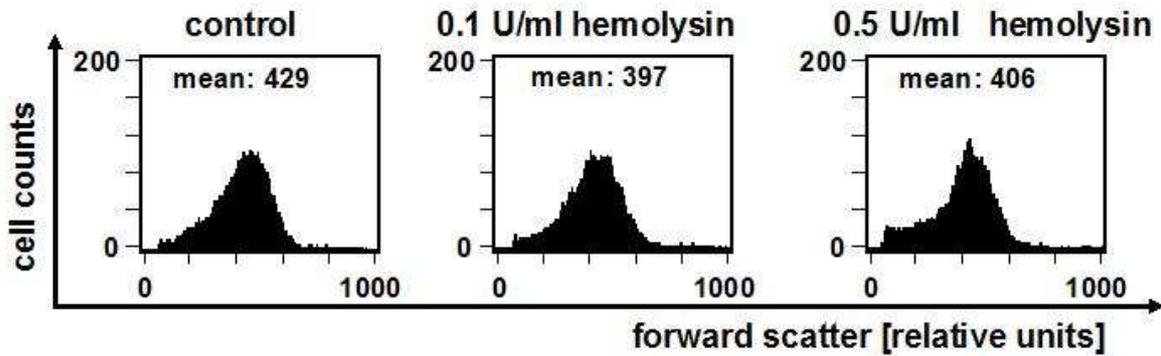


Abb. 12: Original Histogramme der forward scatter von mit Hämolsin inkubierten Erythrozyten aus repräsentativen Experimenten.

Erythrozyten wurden mit 0 U/ml (links), 0,1 U/ml (mitte) und mit 0,5 U/ml (rechts) Hämolsin Kanagawa für 30 min inkubiert. Auf der x-Achse ist der forward scatter, Größenangabe in relativen Einheiten, auf der y-Achse die gemessene Zellzahl aufgetragen. Der forward scatter gibt Auskunft über die Größe der gemessenen Zellen. Es zeigte sich in diesen Experimenten eine deutliche Abnahme des forward scatter und damit eine Zellschrumpfung unter Hämolsineinfluss.

### 3. Versuche und Ergebnisse

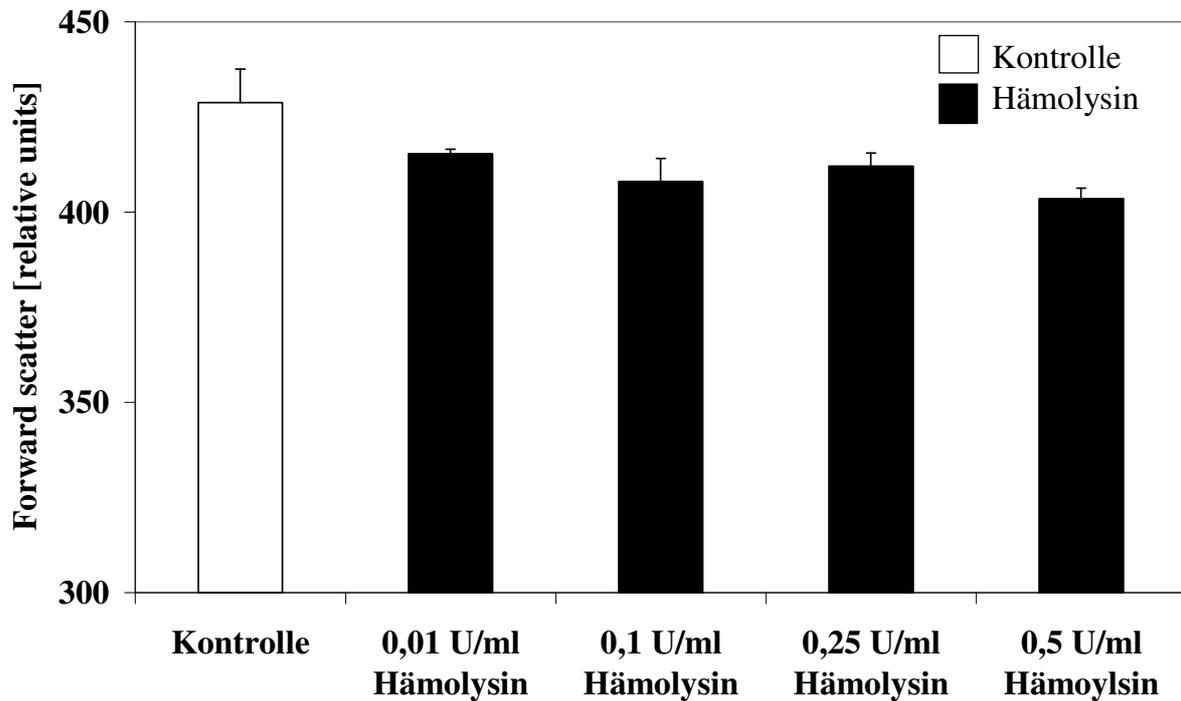


Abb.13: Zellschrumpfung nach 30minütiger Inkubation mit Hämolysin.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen forward scatter nach 30minütiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa.

FSC, 30 min	Kontrolle	0,01 U/ml	0,1 U/ml	0,25 U/ml	0,5 U/ml
n = 1	415,1	415,01	397,5	409,63	406,41
n = 2	412,77	415,2	397,65	404,06	395,07
n = 3	438,76	412,62	418,75	414,76	406,09
n = 4	448,55	418,48	418,36	419,98	406,45
<b>Mittelwert</b>	428,795	415,3275	408,065	412,1075	403,505
<b>Standardabweichung</b>	17,6438	2,407341203	12,1140098	6,829159904	5,625640704
<b>SEM</b>	8,82192	1,203670601	6,057004898	3,414579952	2,812820352

Tab. 16: Zellschrumpfung nach 30minütiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa.

### 3. Versuche und Ergebnisse

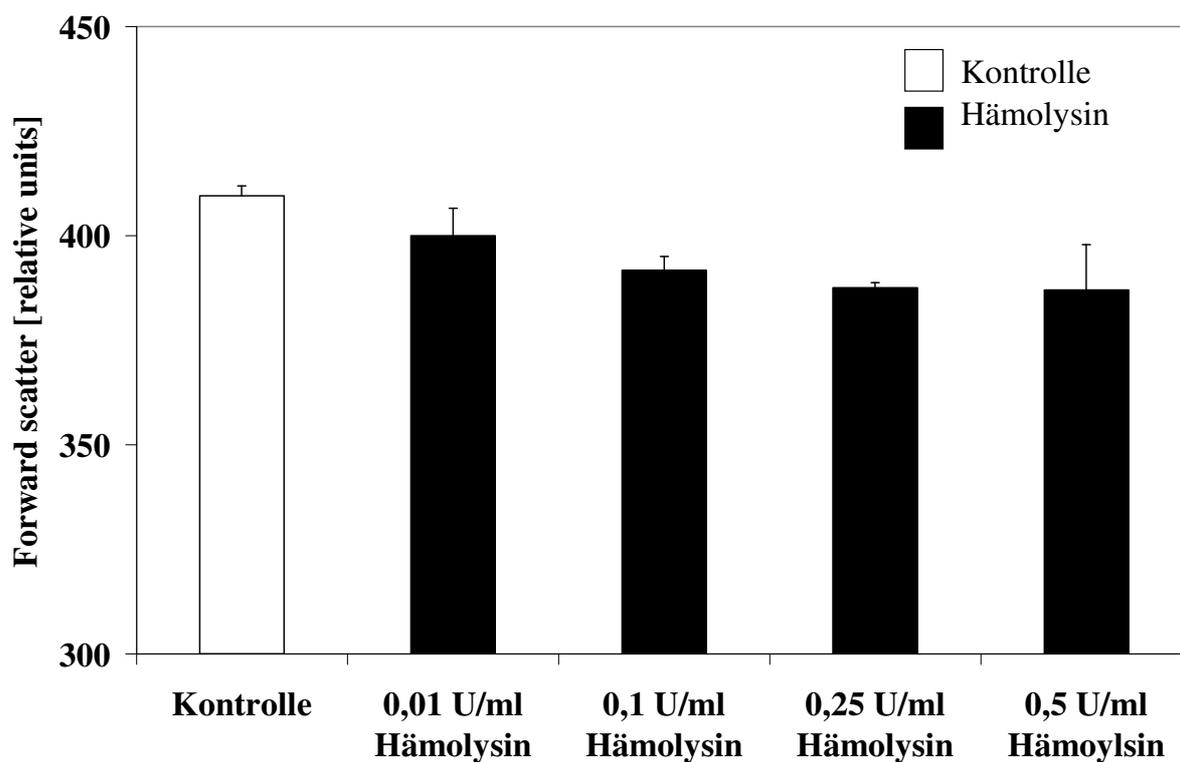


Abb. 14: Zellschrumpfung nach 10stündiger Inkubation mit Hämolysin.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen forward scatter nach 10stündiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa.

FSC, 10 h	Kontrolle	0,01 U/ml	0,1 U/ml	0,25 U/ml	0,5 U/ml
n = 1	403,71	410,34	391,92	384,85	368,93
n = 2	408,23	410,97	389,15	387,33	368,03
n = 3	414,34	383,28	400,63	387,29	408,84
n = 4	411,95	395,18	385,38	390,77	402,31
<b>Mittelwert</b>	409,558	399,9425	391,77	387,56	387,0275
<b>Standardabweichung</b>	4,63867	13,29202863	6,486360048	2,434063817	21,58521465
<b>SEM</b>	2,31934	6,646014313	3,243180024	1,217031909	10,79260733

Tab. 17: Zellschrumpfung nach 10stündiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin.

### 3. Versuche und Ergebnisse

---

Aus den Ergebnissen der Messung des Zellvolumens mittels des forward scatter wird ersichtlich, dass das Hämolyisin eine Schrumpfung der Erythrozyten bewirkt. Diese Schrumpfung ist bereits bei 4minütiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin in Standard-Ringer-Lösung deutlich ersichtlich, in der kalziumfreien Lösung jedoch nicht nachweisbar. Diese durch das Hämolyisin induzierte Schrumpfung ist ebenfalls nicht nachweisbar, wenn der Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  der Standard-Ringer-Lösung zugesetzt wird.

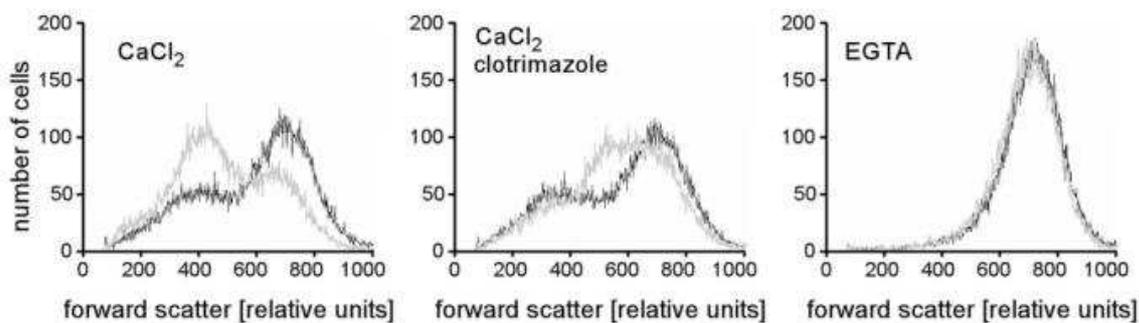


Abb. 15: Original Histogramme der forward scatter menschlicher Erythrozyten unter Kontrollbedingungen (schwarze Linie) und nach Zugabe von 0,1 U/ml Hämolyisin (graue Linie) über 4 min.

Die Messungen erfolgten in Standard-Ringer-Lösung ( $\text{CaCl}_2$ , links) +/- 5  $\mu\text{M}$  Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol (Mitte) und in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung (EGTA, rechts). Auf der x-Achse ist der forward scatter als Maß für die Zellgröße, auf der y-Achse die gemessene Zellzahl aufgetragen. Bei den Erythrozyten in der Standard-Ringer-Lösung war nach Zugabe des Hämolyisins eine deutliche Reduktion des forward scatter zu beobachten. In der Clotrimazol-haltigen Lösung war diese Schrumpfung kaum mehr zu sehen, in der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung war sie komplett aufgehoben.

### 3. Versuche und Ergebnisse

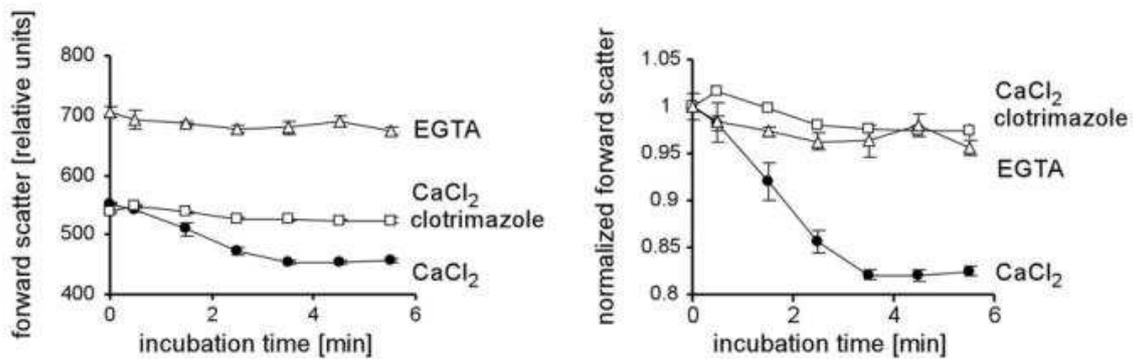


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der durch das Hämolyysin induzierten Veränderungen des forward scatter.

Wiedergegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=3-4$ ) der durch das Hämolyysin induzierten Veränderungen des forward scatter (links) und des normierten forward scatter (rechts).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Hämolyysin Kanagawa eine Erhöhung der Membranpermeabilität für Kalziumionen bewirkt, was wiederum eine Aktivierung des Kalzium-abhängigen Gardos-Kanals zur Folge hat, der nun Kalium aus den Erythrozyten ausströmen lässt. Die direkte Konsequenz aus diesen Ereignissen stellt die über den forward scatter zu beobachtende Zellschrumpfung dar.

Bei länger dauernder Exposition (30 Minuten bzw. 10 Stunden) der Erythrozyten gegenüber verschiedenen Konzentrationen des Hämolyisins (0 U/ml, 0,01 U/ml, 0,1 U/ml, 0,25 U/ml, 0,5 U/ml) ergab die Messung des forward scatter, dass die anfangs bestehende Hämolyysin-induzierte Zellschrumpfung wieder aufgehoben wird.

Dies geschieht am wahrscheinlichsten durch kolloidale Osmose, bedingt durch einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom mit anschließender Schwellung der Erythrozyten. Nach 30 Minuten bzw. 10 Stunden hatte das Hämolyysin in den verschiedenen Konzentrationen im Gegensatz zur kurzzeitig andauernden Exposition also nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellgröße.

#### **3.1.2 Auswirkungen eines extrazellulären Natriumersatzes durch das hochmolekulare Kation NMDG<sup>+</sup> auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolysinexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in natriumhaltiger Standard-Ringer-Lösung und in natriumfreier NMDG-Cl-Lösung vorgenommen. Anschließend wurden die Erythrozyten sowohl mit als auch ohne zugesetzte 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Hierauf erfolgte die Messung des forward scatter am Durchflusszytometer, mit dem das Zellvolumen der Erythrozyten bestimmt werden kann.

Die Erythrozyten, die dem natriumfreien NMDG-Cl-Medium ausgesetzt waren, zeigten keine signifikante Veränderung ihres Zellvolumens. Erst nach Zugabe des Hämolysins konnte ein Unterschied zwischen Zellen in den beiden verschiedenen Lösungen festgestellt werden. So führte das Hämolysin bei den Erythrozyten in der natriumhaltigen Standard-Ringer-Lösung erwartungsgemäß zu einer deutlichen Reduktion des Zellvolumens, weitaus ausgeprägter fand sich diese Schrumpfung allerdings bei den Zellen in der natriumfreien NMDG-Cl-Lösung.

### 3. Versuche und Ergebnisse

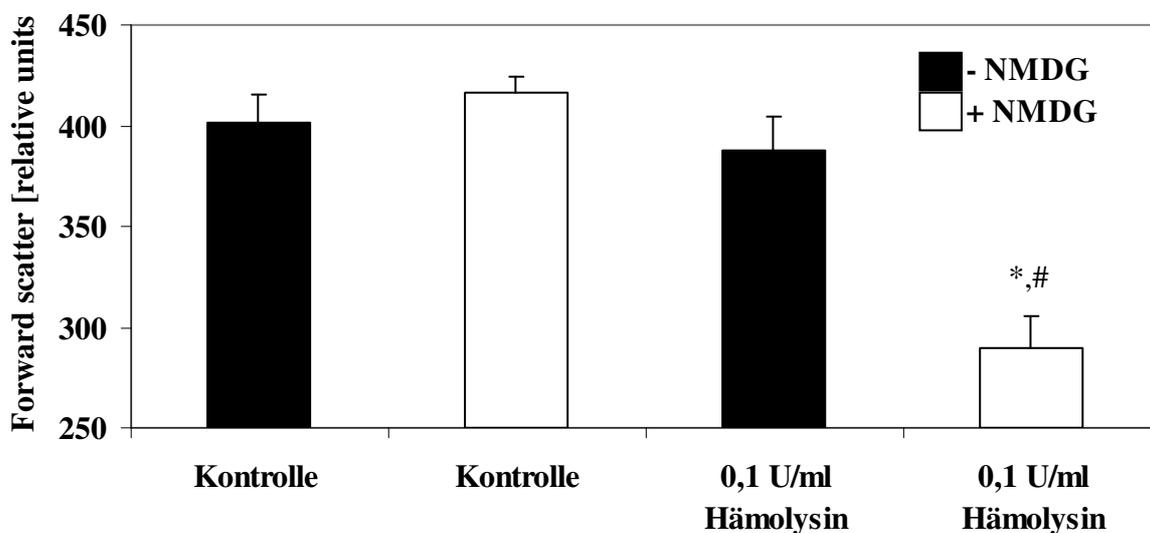


Abb. 17: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit Hämolyisin +/- Zusatz von NMDG-Cl. Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen forward scatter nach 1stündiger Inkubation mit Hämolyisin Kanagawa +/- NMDG-Cl. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied der gemessenen Werte zu denen ohne Hämolyisin, # bezeichnet einen signifikanten Unterschied der gemessenen Werte zu denen ohne NMDG<sup>+</sup> (jeweils  $P \leq 0,05$ , ANOVA-Test).

FSC, 1 h	Kontrolle	Kontrolle + NMDG <sup>+</sup>	0,1 U/ml	0,1 U/ml + NMDG
n = 1	376,1	415,91	379,72	278,84
n = 2	381,7	396,42	344,96	251,05
n = 3	433,11	432,39	424,97	318,53
n = 4	416,13	420,94	399,59	311,32
Mittelwert	401,76	416,415	387,31	289,935
Standardabweichung	27,3871	15,00812336	33,76489597	31,14554275
SEM	13,6935	7,504061678	16,88244799	15,57277138

Tab. 18: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- NMDG-Cl.

Die weniger ausgeprägte Schrumpfung der Zellen im natriumhaltigen Medium lässt verglichen mit den Ergebnissen der Messung der Zellen in der NMDG-Cl-Lösung den Schluss zu, dass das in der Lösung vorhandene Natrium in die Zelle einströmt und somit der durch den Kaliumverlust durch den Gardos-Kanal bedingten osmotischen Zellschrumpfung entgegenwirkt.

#### **3.1.3 Auswirkungen verschiedener extrazellulärer Kaliumkonzentrationen auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolyseexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung (5 mM Kalium), 29 mM Kalium-Ringer-Lösung und 125 mM Kalium-Ringer-Lösung vorgenommen. Die Erythrozyten wurden nach Zugabe von 0,1 U/ml Hämolyse Kanagawa für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Messung des Zellvolumens anhand der forward scatter Bestimmung am Durchflusszytometer.

Wie zu erwarten zeigten die Erythrozyten in der Standard-Ringer-Lösung (5 mM Kalium) unter Hämolyseexposition eine signifikante Abnahme des Zellvolumens, im Vergleich zu den Erythrozyten, die dem Hämolyse nicht ausgesetzt waren.

Erythrozyten, die in der 29 mM Kalium-Ringer-Lösung dem Hämolyse ausgesetzt waren, zeigten eine, allerdings nicht signifikante Erhöhung des Zellvolumens gegenüber den Erythrozyten in der Standard-Ringer-Lösung mit Hämolyse.

Diejenigen Erythrozyten, die in der 125 mM Kalium-Ringer-Lösung mit Hämolyse inkubiert worden waren, zeigten nun ein signifikant erhöhtes Zellvolumen, verglichen mit den Zellen der Standard-Ringer-Lösung mit Hämolyse.

### 3. Versuche und Ergebnisse

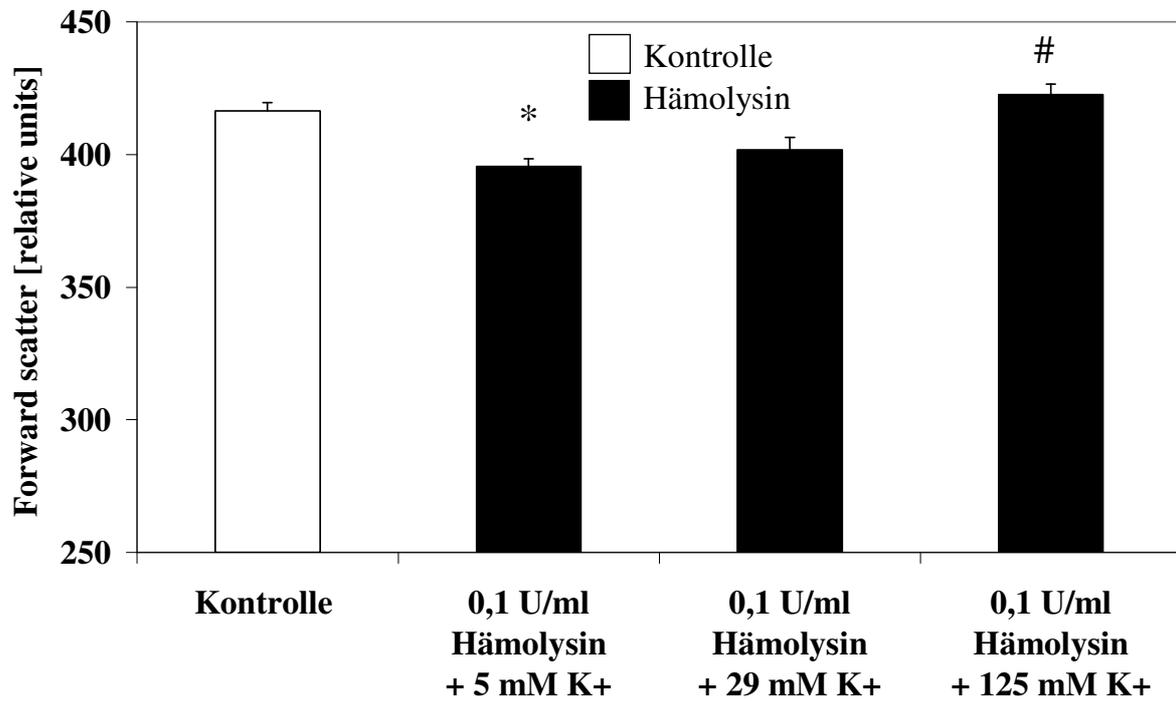


Abb. 18: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit 0, 1U/ml Hämolysin in Lösungen erhöhter  $K^+$ -Konzentrationen.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen Zellvolumina nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa in Standard-Ringer- (5 mM  $K^+$ ), 29 mM-Kalium-Ringer und 125 mM-Kalium-Ringer-Lösung. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Werten ohne Hämolysin-Zugabe, # zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Werten der Zellvolumina in der 5 mM-Kalium-Ringer-Lösung mit zugesetztem Hämolysin (jeweils  $P \leq 0,05$ , ANOVA-Test).

### 3. Versuche und Ergebnisse

<b>FSC, 1h</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0,1 U/ml + 5 mM K<sup>+</sup></b>	<b>0,1 U/ml + 29 mM K<sup>+</sup></b>	<b>0,1 U/ml + 125 mM K<sup>+</sup></b>
<b>n = 1</b>	423,34	392,94	392,22	432,91
<b>n = 2</b>	414,04	389,66	398,05	417,14
<b>n = 3</b>	419,43	402,63	414,83	416,49
<b>n = 4</b>	408,84	397,17	401,63	423,93
<b>Mittelwert</b>	416,4125	395,6	401,6825	422,6175
<b>Standardabweichung</b>	6,326322655	5,604908563	9,584596583	7,642152293
<b>SEM</b>	3,163161327	2,802454282	4,792298292	3,821076146

Tab. 19: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit 0, 1U/ml Hämolysin in Lösungen erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentrationen.

Hieraus kann abgeleitet werden, dass ein K<sup>+</sup>-Kanal an den sich hier abspielenden Vorgängen beteiligt sein muss. Dass es sich hierbei höchst wahrscheinlich um den Gardos-Kanal handelt, zeigt auch das nächste Experiment.

#### **3.1.4 Auswirkungen der Zugabe von 5 µM des Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol zur Standard-Ringer-Lösung auf das erythrozytäre Zellvolumen nach Hämolysinexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung mit und ohne Zugabe von 5 µM des spezifischen Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol vorgenommen. Die Zellen wurden mit 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Bestimmung des Zellvolumens anhand der forward scatter Messung am Durchflusszytometer.

Wie auch hier wieder zu erwarten war, zeigten die Erythrozyten in der Standard-Ringer-Lösung ohne Clotrimazol eine signifikante Abnahme ihres Volumens unter der Einwirkung des Hämolysins.

Die Erythrozyten, deren Lösung 5 µM Clotrimazol enthielt, zeigten eine weniger deutliche Volumenabnahme nach Hämolysinzugabe.

### 3. Versuche und Ergebnisse

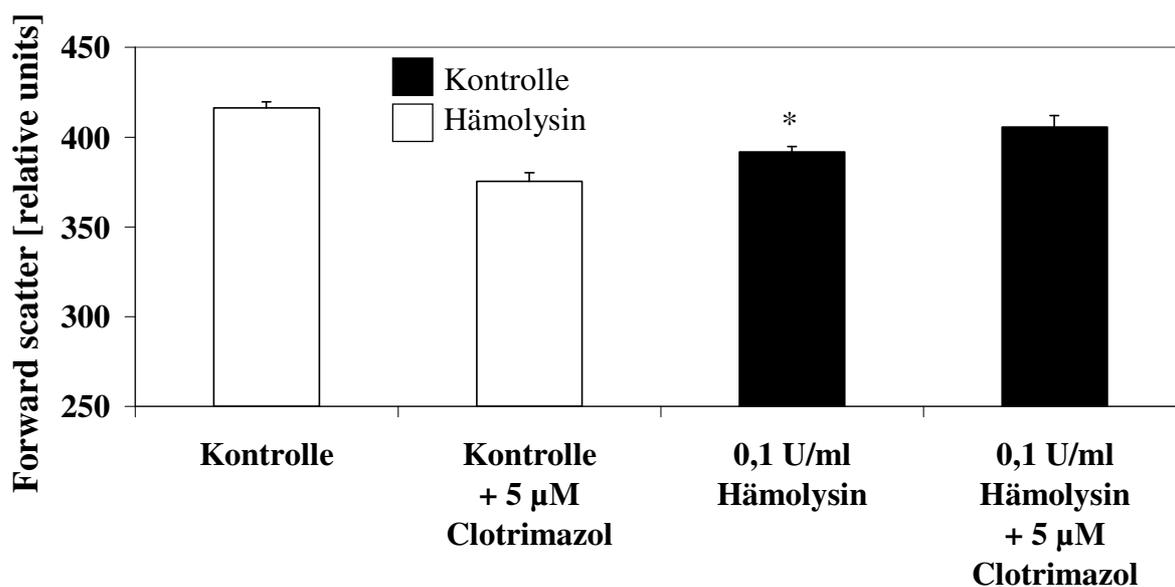


Abb. 19: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- 5 µM Clz.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen forward scatter nach 1stündiger Inkubation der Erythrozyten mit 0,1 U/ml Hämolyisin Kanagawa +/- 5 µM Clotrimazol. \* zeigt einen signifikanten Unterschied der Messwerte zu denjenigen ohne zugesetztes Hämolyisin ( $P \leq 0,05$ , zweiseitiger t-Test).

FSC, 1 h	Kontrolle	Kontrolle + 5µM Clz	0,1 U/ml	0,1 U/ml + 5µM Clz
n = 1	423,34	368	383	420
n = 2	414,04	372	393	412
n = 3	419,43	390	397	399
n = 4	408,84	371	394	392
Mittelwert	416,4125	375,25	391,75	405,75
Standardabweichung	6,32632265	9,97914492	6,07590871	12,6062154
SEM	3,16316133	4,98957246	3,03795436	6,3031077

Tab. 20: Zellvolumen nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- 5 µM Clz.

### 3. Versuche und Ergebnisse

Da Clotrimazol ein spezifischer Blocker des Gardos-Kanals ist und die Schrumpfung der Erythrozyten weitaus geringer ausfällt, wenn dieser Kanal geblockt wird, so kann geschlossen werden, dass der hierbei beteiligte  $K^+$ -Kanal tatsächlich dieser Gardos-Kanal ist. Er bewirkt einen  $K^+$ -Ausstrom mit anschließender osmotisch bedingter Schrumpfung der Zellen.

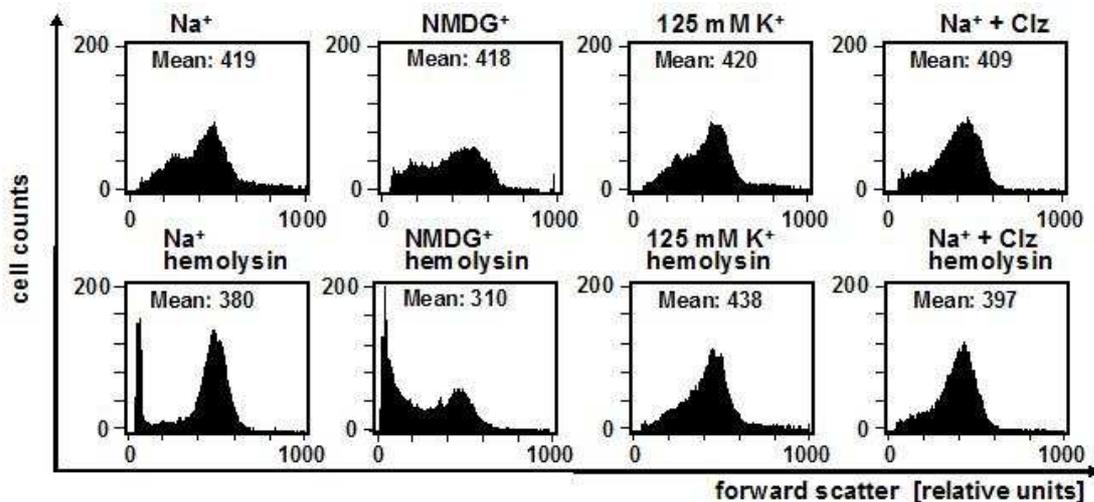


Abb. 20: Auswirkungen von natriumfreier, 125 mM und Clotrimazol-haltiger Lösung auf das Zellvolumen von mit Hämolyisin behandelten Erythrozyten. Original Histogramme aus repräsentativen Experimenten.

Die Inkubation der Erythrozyten erfolgte in Standard-Ringer- ( $Na^+$ ), natriumfreier NMDG-Cl- (NMDG $^+$ ), 125 mM Kalium-Ringer- (125 mM  $K^+$ ) und 5  $\mu$ M Clotrimazol-haltiger Standard-Ringer-Lösung ( $Na^+ + Clz$ ). Die Erythrozyten wurden für 30 min mit 0,1 U/ml Hämolyisin Kanagawa behandelt. Auf der x-Achse sind die forward scatter als Maß für die Zellgröße, auf der y-Achse die gemessene Zellzahl aufgetragen. Die Erythrozyten in der Standard-Ringer-Lösung unterlagen einer starken Zellschrumpfung, die durch natriumfreie Lösung verstärkt und durch erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration sowie Clz deutlich reduziert wurde.

## 3.2 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen mittels der Annexin-V-Färbung und Messung über FL1 am FACS

### 3.2.1 Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran nach Hämolysexposition

Für den ersten Teil dieses Versuchs wurden die Erythrozyten in Standard-Ringer-Lösung und mit Hämolyisin Kanagawa der Konzentrationen 0,1 U/ml und 0,5 U/ml für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Färbung der Phosphatidylserin-präsentierenden Zellen mittels Annexin-V-Fluos konnte die Messung der apoptotischen Erythrozyten am Durchflusszytometer erfolgen.

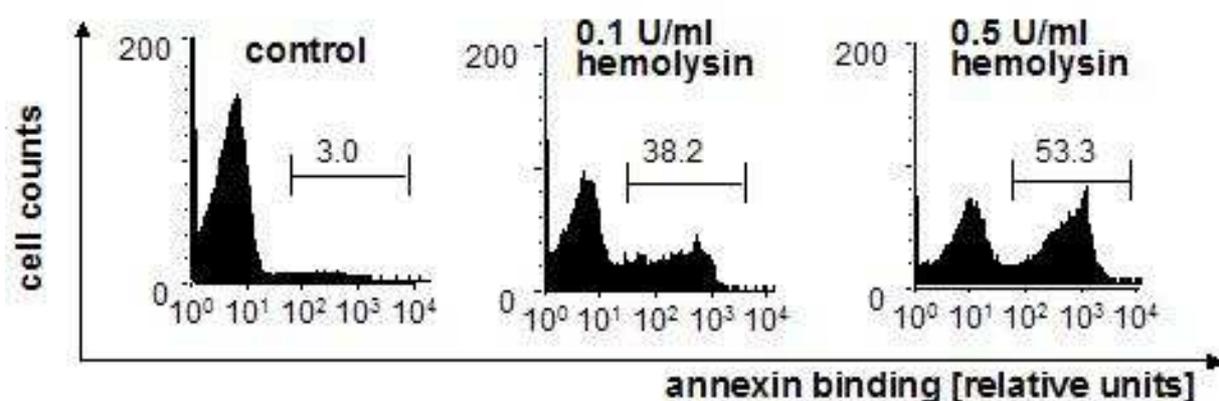


Abb. 21: Original Histogramme der Annexin-Bindung bei Erythrozyten nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Hämolyisin.

Erythrozyten wurden für 30 min mit 0,1 U/ml und 0,5 U/ml Hämolyisin Kanagawa inkubiert. Auf der x-Achse sind die forward scatter als Maß für die Zellgröße und auf der y-Achse die gemessene Zellzahl aufgetragen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Rate an Annexin-positiven Zellen, verglichen mit derjenigen der unbehandelten Erythrozyten.

Durch die Detektion der Annexin-bindenden Zellen über FL1 des Durchflusszytometers konnte bei den Erythrozyten, die dem Hämolyisin ausgesetzt waren, eine deutliche Zunahme der Rate der apoptotischen Zellen festgestellt werden. So zeigten die Erythrozyten im hämolyisinfreien Medium eine äußerst geringe Apoptoserate, die im Medium mit 0,1 U/ml

### 3. Versuche und Ergebnisse

---

Hämolysin schon stark erhöht war. Im Medium mit 0,5 U/ml Hämolysin steigerte sich diese Apoptoserate dann noch einmal erheblich.

Somit ist die über den forward scatter bereits festgestellte Schrumpfung der Erythrozyten unter Hämolysinexposition als typische Begleiterscheinung bei in Apoptose befindlichen Erythrozyten zu werten, da sich der Anteil der Annexin-bindenden Zellen unter Einfluss des Hämolysins ebenfalls signifikant erhöht.

Im zweiten Teil des Versuchs sollte nun untersucht werden, wie sich eine länger andauernde Hämolysinexposition auf den Anteil der Annexin-bindenden und somit apoptotischen Zellen auswirkt. Hierfür wurden die Erythrozyten nun wieder in Standard-Ringer-Lösung mit Hämolysin Kanagawa in den Konzentrationen 0,01 U/ml, 0,1 U/ml, 0,25 U/ml und 0,5 U/ml bei 37°C für 30 Minuten und 10 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Erythrozyten mit Annexin-V-Fluos und die Bestimmung der Annexin-bindenden Zellen mittels des Durchflusszytometers.

Während in der Kontrolle ohne Hämolysin nach 30 Minuten nur 1,3 +/- 0,1 % und nach 10 Stunden immer noch nur 3,5 +/- 0,7 % Annexin-positive und somit in Apoptose befindliche Zellen detektiert wurden, stieg deren Anteil nach 30minütiger Exposition gegenüber 0,1 U/ml Hämolysin bereits signifikant auf 31 +/- 12 %. Höhere Konzentrationen des Hämolysins bewirkten eine weitere Zunahme der Apoptoserate.

Nach 10 Stunden andauernder Hämolysinexposition blieb der Anteil der Annexin-positiven Zellen weiterhin signifikant erhöht.

### 3. Versuche und Ergebnisse

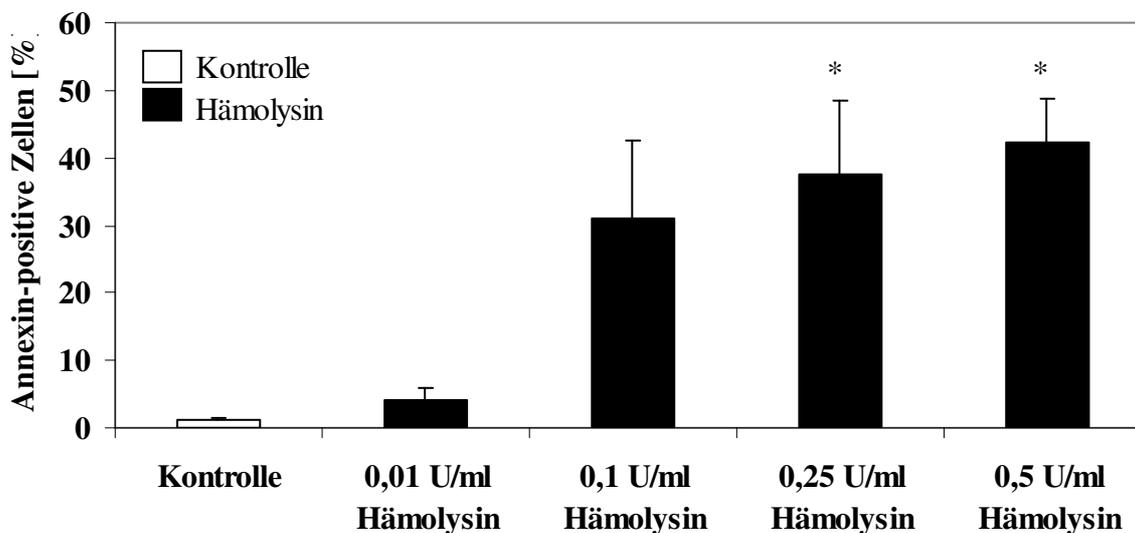


Abb. 22: Annexin-Bindung nach 30minütiger Inkubation mit Hämolysin.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) des jeweils gemessenen Anteils apoptotischer Erythrozyten nach 30minütiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten ohne Hämolysin ( $P \leq 0,05$ , ANOVA-Test).

Annexin, 30 min	Kontrolle	0,01 U/ml	0,1 U/ml	0,25 U/ml	0,5 U/ml
n = 1	1,02	2,67	8,91	20,48	29,18
n = 2	1,16	1,04	12,91	16,3	33,06
n = 3	1,35	8,94	49,74	55,02	54,01
n = 4	1,53	4,32	52,46	58	53,23
<b>Mittelwert</b>	1,265	4,2425	31,005	37,45	42,37
<b>Standardabweichung</b>	0,22249	3,405939665	23,28758825	22,10814933	13,09047236
<b>SEM</b>	0,11124	1,702969832	11,64379413	11,05407466	6,545236181

Tab. 21: Annexin-Bindung nach 30minütiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin.

### 3. Versuche und Ergebnisse

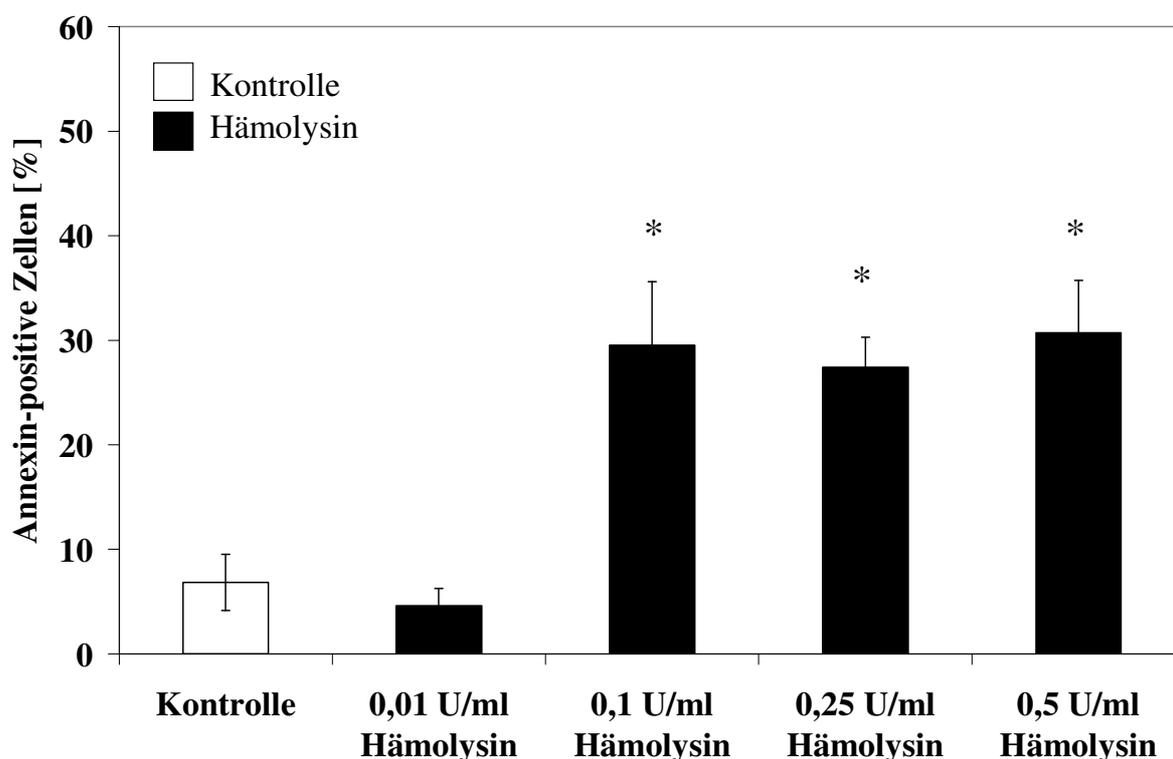


Abb. 23: Annexin-Bindung nach 10stündiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) des jeweils gemessenen Anteil Annexin-positiver Zellen nach 10stündiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa.\* zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten der ohne Hämolysin inkubierten Zellen (P ≤ 0,05, ANOVA-Test).

Annexin, 30 min	Kontrolle	0,01 U/ml	0,1 U/ml	0,25 U/ml	0,5 U/ml
n = 1	4,5	2,54	19,24	24,67	24,57
n = 2	2,44	1,17	20,43	20,52	22,76
n = 3	5,8	6,9	44,8	31,5	30,7
n = 4	14,6	7,9	33,7	32,9	44,9
Mittelwert	6,835	4,6275	29,5425	27,3975	30,7325
Standardabweichung	5,35832	3,27543763	12,10034814	5,826584906	10,03753414
SEM	2,67916	1,637718815	6,050174068	2,913292453	5,018767071

Tab. 22: Annexin-Bindung nach 10stündiger Inkubation mit 0,01-0,5 U/ml Hämolysin.

Hämolysin Kanagawa bewirkt also in konzentrationsabhängiger Weise eine Apoptoseinduktion bei den Erythrozyten, die sich auch nach 10 Stunden noch durch eine Annexinbindung nachweisen lässt und somit irreversibel und unabhängig von der bereits beschriebenen osmotischen Wiederaufschwellung abläuft.

#### **3.2.2 Auswirkungen eines extrazellulären Natriumersatzes durch das hochmolekulare Kation NMDG<sup>+</sup> auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Zellmembran nach Hämolysinexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in natriumhaltiger Standard-Ringer-Lösung und in natriumfreier NMDG-Cl-Lösung vorgenommen. Die Erythrozyten wurden für 1 Stunde bei 37°C mit 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa inkubiert, anschließend mit Annexin-V-Fluos gefärbt und die Rate der Phosphatidyl-präsentierenden Zellen über FL1 am Durchflusszytometer gemessen.

Die Messungen ergaben, dass sich die Rate der apoptotischen Zellen unter der Wirkung des Hämolysins in der natriumfreien NMDG-Cl-Lösung, bezogen auf die in der natriumhaltigen Standard-Ringer-Lösung, nicht in signifikanter Weise verändert hat.

### 3. Versuche und Ergebnisse

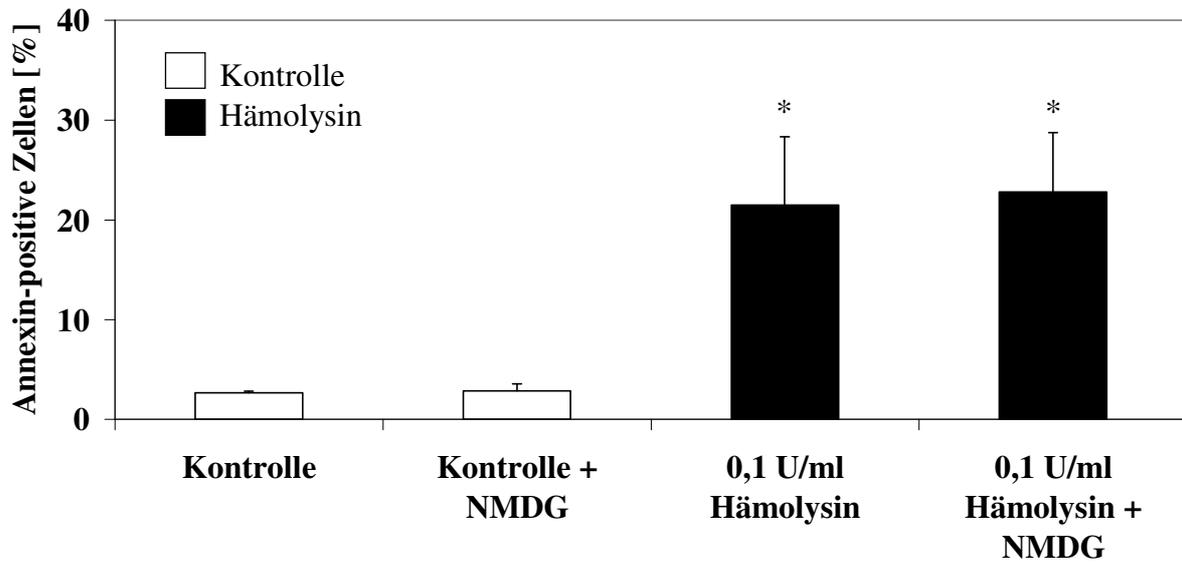


Abb. 24: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit Hämolyisin +/- NMDG-Cl.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) des gemessenen Anteils Annexin-positiver Zellen nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin Kanagawa +/- NMDG-Cl. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten ohne Zugabe von Hämolyisin ( $P \leq 0,05$ , zweiseitiger t-Test).

Annexin, 1 h	Kontrolle	Kontrolle + NMDG-Cl	0,1 U/ml	0,1 U/ml + NMDG-Cl
n = 1	2,77	1,52	30,59	37,38
n = 2	2,97	4,41	35,57	27,49
n = 3	2,2	3,54	8,04	13,88
n = 4	2,72	2,03	11,76	12,44
<b>Mittelwert</b>	2,665	2,875	21,49	22,7975
<b>Standardabweichung</b>	0,32828	1,335227821	13,62145122	11,85282632
<b>SEM</b>	0,16414	0,66761391	6,81072561	5,926413158

Tab. 23: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- NMDG-Cl.

Insofern spielt das extrazelluläre Natrium keine Rolle für die Wirkung des Hämolyisins auf die Apoptoseinduktion.

Die im früheren Experiment gemessene verstärkte Schrumpfung der Erythrozyten nach Hämolysinexposition in der natriumfreien NMDG-Cl-Lösung, verglichen mit der weniger stark ausgeprägten Schrumpfung in der natriumhaltigen Standard-Ringer-Lösung, lässt sich somit darauf zurück führen, dass diese Zellen keinen  $\text{Na}^+$ -Einstrom zum osmotischen Ausgleich der durch den  $\text{K}^+$ -Ausstrom durch den Gardos-Kanal bedingten Zellschrumpfung betreiben können.

Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des Hämolysins bezogen auf die Einleitung der erythrozytären Apoptose, da die Rate der Annexin-bindenden Zellen unabhängig vom extrazellulären Natriumgehalt ist.

#### **3.2.3 Auswirkungen verschiedener extrazellulärer $\text{K}^+$ -Konzentrationen auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie nach Hämolysinexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung (5 mM Kalium), 29 mM Kalium-Ringer-Lösung und 125 mM Kalium-Ringer-Lösung vorgenommen. Die Erythrozyten wurden nach Zugabe von 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend mit Annexin-V-Fluos gefärbt und die Rate der apoptotischen Zellen mittels des Durchflusszytometers bestimmt.

Die Messungen ergaben, dass eine erhöhte extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration die Rate der apoptotischen Zellen nach Hämolysinzugabe im Vergleich zu der in der Standard-Ringer-Lösung mit nur 5 mM Kalium signifikant reduzierte. So fanden sich in der 25 mM Kalium-Ringer-Lösung deutlich weniger apoptotische Zellen als in der 5 mM Kalium-Lösung. Noch deutlicher ausgeprägt zeigte sich diese Reduktion des Anteils apoptotischer Zellen in der 125 mM Kalium-Ringer-Lösung.

### 3. Versuche und Ergebnisse

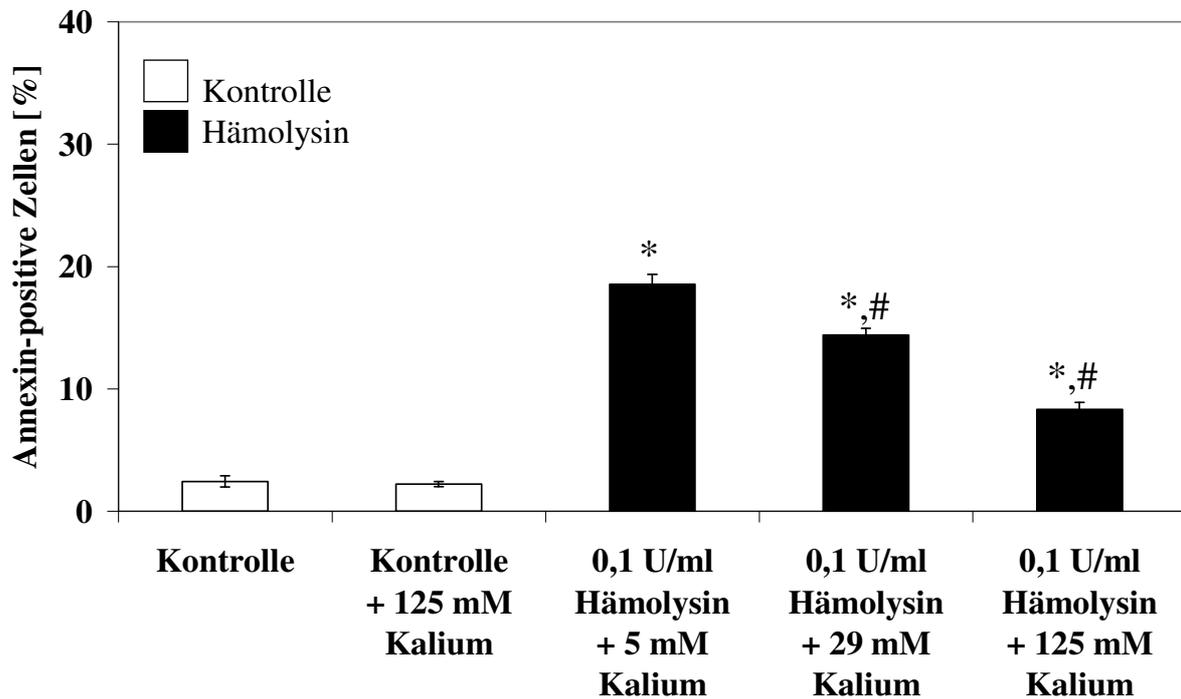


Abb. 25: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolysin +/- 5 mM, 29 mM, oder 125 mM Kalium.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) des jeweils ermittelten Anteils Annexin-positiver Erythrozyten, die für 1 h mit 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa in Lösungen unterschiedlicher K<sup>+</sup>-Konzentrationen (5 mM, 29 mM, 125 mM Kalium) inkubiert wurden. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten der ohne Hämolysin inkubierten Erythrozyten, # zeigt einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Messwerten der in der 5 mM Kalium-Lösung inkubierten Erythrozyten (jeweils P ≤ 0,05, ANOVA-Test).

### 3. Versuche und Ergebnisse

<b>Annexin, 1h</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle + 125 mM K<sup>+</sup></b>	<b>0,1 U/ml + 5 mM K<sup>+</sup></b>	<b>0,1 U/ml + 29 mM K<sup>+</sup></b>	<b>0,1 U/ml + 125 mM K<sup>+</sup></b>
<b>n = 1</b>	3,74	2,44	16,33	13,42	8,38
<b>n = 2</b>	1,73	2,69	19,31	15,28	9,8
<b>n = 3</b>	2,39	1,94	18,32	15,39	7,01
<b>n = 4</b>	1,9	1,81	20,18	13,58	8,17
<b>Mittelwert</b>	2,44	2,22	18,535	14,4175	8,34
<b>Standardabweichung</b>	0,910714006	0,41465	1,654780952	1,062399015	1,144697922
<b>SEM</b>	0,455357003	0,20732	0,827390476	0,531199507	0,572348961

Tab. 24: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- 5 mM, 29 mM, oder 125 mM Kalium.

Erhöhte extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentrationen hemmen also die extra-erythrozytäre Phosphatidylserinexposition. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in derartigen Medien wie 25 mM bzw. 125 mM Kalium-Ringer-Lösungen der K<sup>+</sup>-Ausstrom durch den Gardos-Kanal wegen des herabgesetzten Konzentrationsgradienten zwischen Innen und Außen sehr viel geringer ausfällt und somit die Zellschrumpfung wesentlich verringert wird. Da die Zellschrumpfung als Trigger für die Scramblase angesehen wird, unterbleibt der Phosphatidylserin-Flip-Flop auf die Membranaußenseite und somit die Apoptose.

#### **3.2.4 Auswirkungen der Zugabe von 5 µM des Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol zur Standard-Ringer-Lösung auf den Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der erythrozytären Plasmamembran nach Hämolyisexposition**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung mit und ohne Zugabe von 5 µM des spezifischen Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol vorgenommen. Die Zellen wurden nach Zugabe von 0,1 U/ml Hämolyisin Kanagawa für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach mit Annexin-V-Fluos gefärbt. Anschließend wurde die Rate der apoptotischen Zellen mittels des Durchflusszytometers bestimmt.

### 3. Versuche und Ergebnisse

Hierbei wurde, wie schon im Versuch mit den erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen, eine signifikante Verminderung der apoptotischen Zellen in der Lösung mit zugesetztem Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol festgestellt. So verminderte das Clotrimazol die Rate der Phosphatidylserin-exponierenden Zellen nach Hämolyzinzugabe um  $60,2 \pm 3,3\%$  verglichen mit den Zellen, die ohne Clotrimazol dem Hämolyisin ausgesetzt waren.

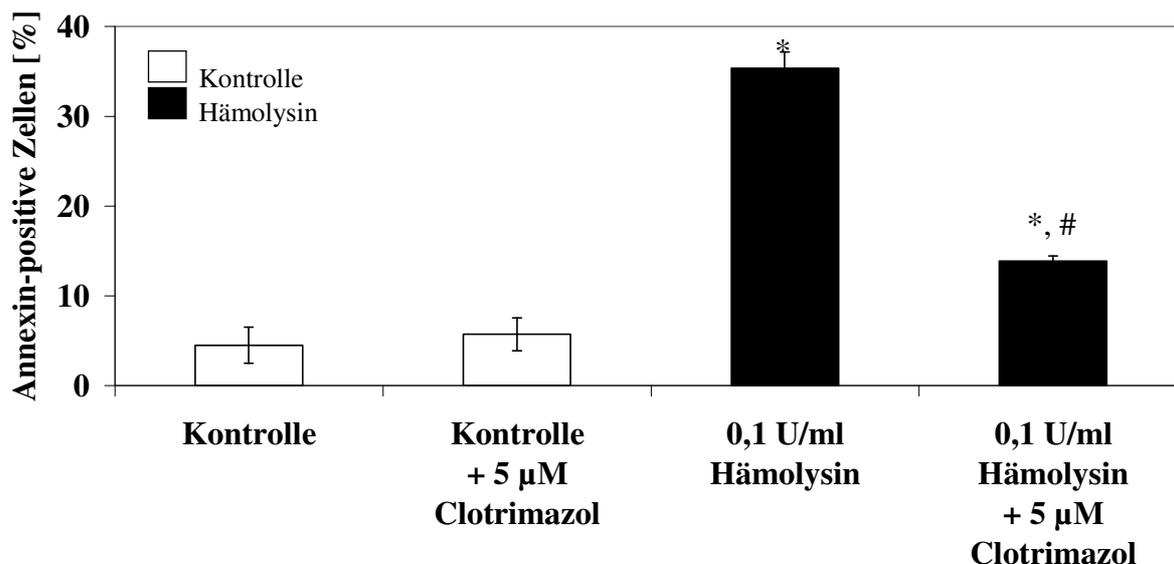


Abb. 26: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- 5 µM Clz.

Mittelwerte +/- SEM (n=4) der gemessenen Anteile Annexin-positiver Zellen nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolyisin Kanagawa +/- 5µM Clotrimazol. \* bezeichnet einen signifikanten Unterschied zu den gemessenen Werten ohne Hämolyisin, # bezeichnet einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten ohne Clotrimazol (jeweils  $P \leq 0,05$ , ANOVA-Test).

### 3. Versuche und Ergebnisse

Annexin, 1 h	Kontrolle	Kontrolle + 5µM Clz	0,1 U/ml	0,1 U/ml + 5µM Clz
n = 1	8,05	6,78	36,02	14,28
n = 2	7,92	3,98	40,08	12,42
n = 3	0,95	10,27	33,84	14,11
n = 4	1,07	1,78	31,49	14,79
Mittelwert	4,4975	5,7025	35,3575	13,9
Standardabweichung	4,02766578	3,66860896	3,651541912	1,028105053
SEM	2,01383289	1,83430448	1,825770956	0,514052526

Tab. 25: Annexin-Bindung nach 1stündiger Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolysin +/- 5 µM Clz.

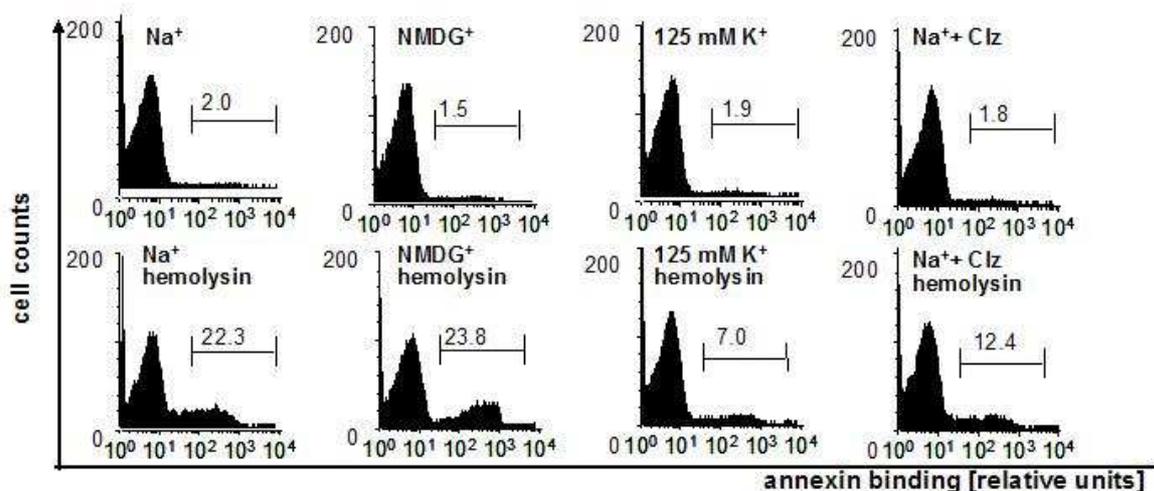


Abb. 27: Auswirkungen von natriumfreier, 125 mM und Clotrimazol-haltiger Lösung auf die Annexin-Bindung von mit Hämolysin behandelten Erythrozyten. Original Histogramme repräsentativer Experimente.

Histogramme der Annexin-Bindung nach Inkubation von Erythrozyten für 1 h ohne Hämolysin Kanagawa (obere Reihe) und mit 0,1 U/ml Hämolysin (untere Reihe). Die Ansätze wurden in Standard-Ringer-, natriumfreier NMDG-, 125 mM Kalium-Ringer- und Clotrimazol-haltiger Standard-Ringer-Lösung vorgenommen. Auf der x-Achse ist der forward scatter als Maß für die Zellgröße, auf der y-Achse die gemessene Zellzahl aufgetragen. Es zeigte sich in der Standard-Ringer-Lösung ein deutlich vermehrter Anteil Annexin-positiver Zellen nach Inkubation mit Hämolysin. Dieser Anteil wurde durch die natriumfreie Lösung nicht zusätzlich erhöht, in 125 mM K<sup>+</sup>- und Clz-haltiger Lösung sogar stark reduziert.

Also führt auch eine direkte Blockade des Gardos-Kanals zu verringerter erythrozytärer Apoptose, da wiederum die Zellschrumpfung als möglicher Trigger der Scramblase ausbleibt.

### **3.3 Flammenemissionsphotometrisch bestimmte $K^+$ -Freisetzung**

#### **3.3.1 $K^+$ -Freisetzung nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen Hämolysin Kanagawa und Zugabe des Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol, gemessen mittels der Flammenemissionsphotometrie**

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung und in Standard-Ringer-Lösung mit Zusatz von 5  $\mu$ M des Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol vorgenommen. Nach Zugabe von 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa und einer Inkubationszeit von 60 Minuten erfolgte die Messung des vom Erythrozyten freigesetzten Kaliums mittels der Flammenemissionsphotometrie. Die ermittelten Werte wurden in Prozent des durch das  $K^+$ -Ionophor Valinomycin maximal freigesetzten intrazellulären Kaliums angegeben.

### 3. Versuche und Ergebnisse

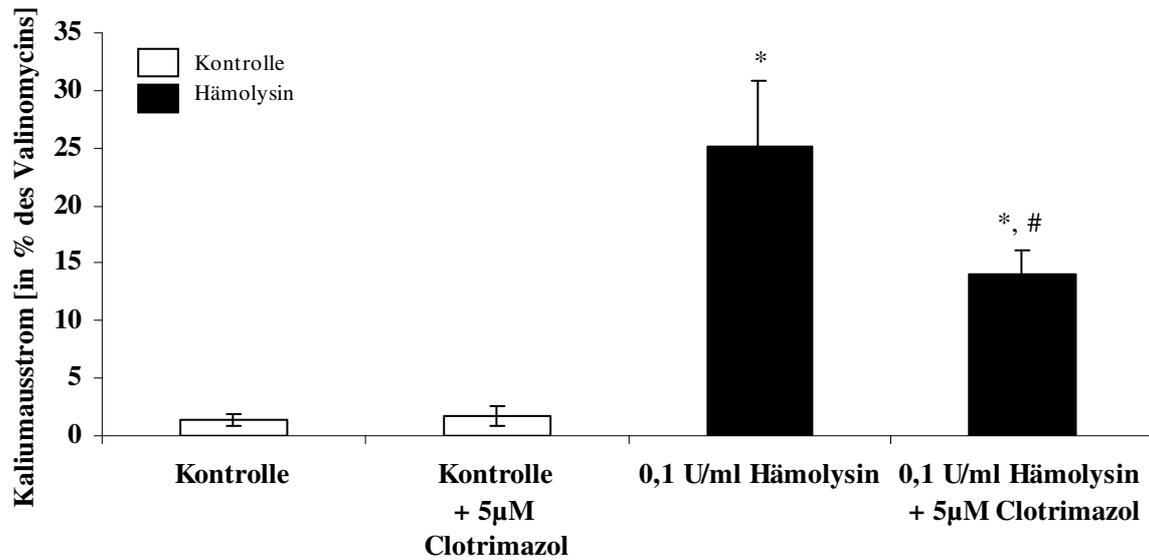


Abb. 28: K<sup>+</sup>-Freisetzung und das Fehlen einer frühen Hämolyse nach Behandlung mit Hämolysin Kanagawa in niedrigen Konzentrationen.

Mittelwerte +/- SEM der K<sup>+</sup>-Freisetzung aus Erythrozyten (angegeben in Prozent des durch Valinomycin ausgelösten K<sup>+</sup>-Verlustes aus Erythrozyten), die für 1 h mit 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa +/- Clotrimazol (Clz) inkubiert wurden. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten ohne Hämolysin, # zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Messwerten ohne Zugabe von Clotrimazol (jeweils  $P \leq 0,05$ , Repeated measures ANOVA with post-test).

### 3. Versuche und Ergebnisse

<b>Kaliumausstrom (% Valinomycin)</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle + 5µM Clz</b>	<b>0,1 U/ml</b>	<b>0,1 U/ml + 5 µM Clz</b>
<b>n = 1</b>	0,684046	0,650678	18,869656	13,138686
<b>n = 2</b>	1,794004	0,601936	14,367771	7,836966
<b>n = 3</b>	3,826745	5,859265	48,780488	22,701149
<b>n = 4</b>	0,782496	1,57496	34,599282	14,578349
<b>n = 5</b>	1,070296	1,017442	13,213531	12,552854
<b>n = 6</b>	0,463392	0,915199	20,962687	13,716404
<b>Mittelwert</b>	1,43682983	1,7699133	25,13223583	14,087401
<b>Standardabweichung</b>	1,25825533	2,033441	13,88091543	4,8352488
<b>SEM</b>	0,51368059	0,8301488	5,666859993	1,9739821

Tab. 26: Kaliumausstrom nach 1stündiger Inkubation mit mit 0,1 U/ml Hämolyisin +/- 5 µM Clz.

Nach Zugabe des Hämolyisins zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Zunahme der K<sup>+</sup>-Freisetzung, die durch den Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol wiederum signifikant reduziert werden konnte.

Dieser Versuch zeigt, dass das Hämolyisin Kanagawa die Erythrozyten zur K<sup>+</sup>-Freisetzung mit nachfolgender osmotischer Zellschrumpfung anregt, und dass dieser K<sup>+</sup>-Verlust durch den Gardos-Kanal geschieht, da der spezifische Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol den K<sup>+</sup>-Verlust signifikant reduziert.

### 3.4 Photometrische Messung des Anteils hämolytischer Erythrozyten

#### 3.4.1 Messung der Hämolyse bei Erythrozyten, die mit niedrigen Konzentrationen des Hämolysins Kanagawa behandelt wurden

Für diesen Versuch wurden die Ansätze in Standard-Ringer-Lösung vorgenommen. Der Hämatokrit wurde auf 5% eingestellt, dies geschah durch Zugabe von jeweils 50 µl des Erythrozytenkonzentrats zu 1 ml der Standard-Ringer-Lösung. Nach Zugabe von 0,01 U/ml, 0,1 U/ml, 0,25 U/ml oder 0,5 U/ml des Hämolysins Kanagawa erfolgten mehrfach im Verlauf der Inkubation über bis zu 10 Stunden bei 37°C photometrische Messungen der bis dahin stattgefundenen Hämolyse.

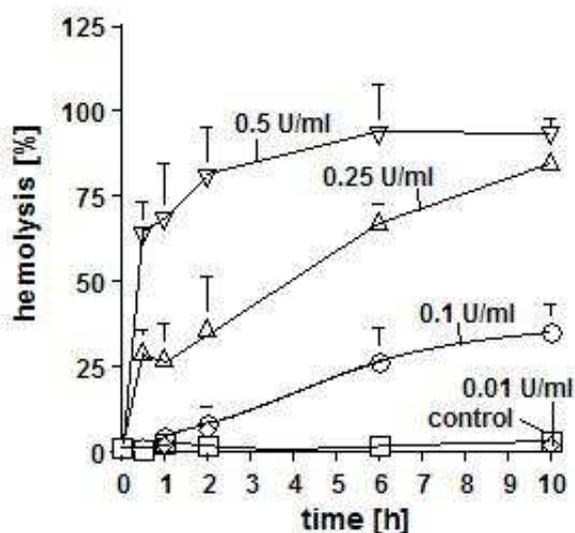


Abb. 29: Hämolyse von Erythrozyten, die bis zu 10 h mit verschiedenen Hämolysinkonzentrationen inkubiert wurden.

Mittelwerte +/- SEM (n=4-6) der Hämolyse (Angaben in % der vollständigen Hämolyse) von Erythrozyten, die bis zu 10 h mit 0,1-0,5 U/ml Hämolysin Kanagawa inkubiert wurden.

Erwartungsgemäß führte das Hämolysin Kanagawa zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Hämolyse.

So zeigten in der Kontrolle ohne Hämolysin weniger als 1% ( $0,8 \pm 0,5\%$ ) der Erythrozyten eine Hämoglobinfreisetzung. Dieser Wert stieg innerhalb von 6 Stunden geringfügig auf  $1,9 \pm 0,3\%$  und innerhalb von 10 Stunden auf  $2,6 \pm 1,1\%$  an.

Wurden  $0,01 \text{ U/ml}$  des Hämolysins zugesetzt, so ergab die Messung der Hämolyserate über 10 Stunden keine erhöhten Werte bezogen auf die Kontrolle ohne Hämolysin.

$0,1 \text{ U/ml}$  des Hämolysins führten innerhalb 1 Stunde zu keiner signifikanten Hämolyse. Die Rate hämolytischer Erythrozyten in diesem Fall betrug lediglich  $2,5 \pm 0,3\%$ .

Über 10 Stunden Inkubation erhöhte sich der Anteil der hämolytischen Zellen dann auf  $35 \pm 8\%$ .

Eine Hämolysinexposition von  $0,25 \text{ U/ml}$  bewirkte bereits innerhalb von 30 Minuten ausgeprägte Hämoglobinfreisetzung, und der Anteil der hämolytierten Zellen betrug  $29 \pm 6\%$ .

Noch ausgeprägter fand sich dies bei  $0,5 \text{ U/ml}$  Hämolysin mit einem Anteil von  $63 \pm 10\%$  nach 30 Minuten Inkubation und fast vollständiger Hämolyse ( $92 \pm 5\%$ ) der Erythrozyten nach 10 Stunden.

### **3.5 Bestimmung der Ströme über die Erythrozytenmembran mittels des Patch-Clamp Verfahrens**

#### **3.5.1 Durch das Hämolysin Kanagawa induzierte, nichtselektive Kationströme in menschlichen Erythrozyten, gemessen in der „whole-cell-Konfiguration“**

Für diesen Versuch wurde KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung und als Spüllösungen natriumhaltige NaCl-Standardspüllösung, natriumfreie NMDG-Cl-Spüllösung und hochkalziumhaltige  $\text{CaCl}_2$ -Spüllösung verwendet.

### 3. Versuche und Ergebnisse

Den Spüllösungen wurde 1 U/ml Hämolysin Kanagawa zugesetzt, die Kontrollen blieben hämolysinfrei.

Die Messungen erfolgten in der „whole-cell-Konfiguration“ und ergaben für die Kontrolle, die mit KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung und natriumhaltiger NaCl-Standardspüllösung durchgeführt wurde, sehr niedrige „whole-cell-Ströme“. Diese einwärts gerichteten Ströme von  $-5,6 \pm 1,6$  pA bei  $-100$  mV ( $n=5$ ) unterschieden sich nicht von denen, die mit identischen Lösungen in der „cell-attached-Konfiguration“ gemessen werden konnten und  $-4,5 \pm 0,3$  pA ( $n=6$ ) betragen. Auch befanden sie sich im Bereich der bei einem unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen zu erreichenden Seal-Widerstand von 10-30 G $\Omega$  zu erwartenden durchsickernden Ströme.

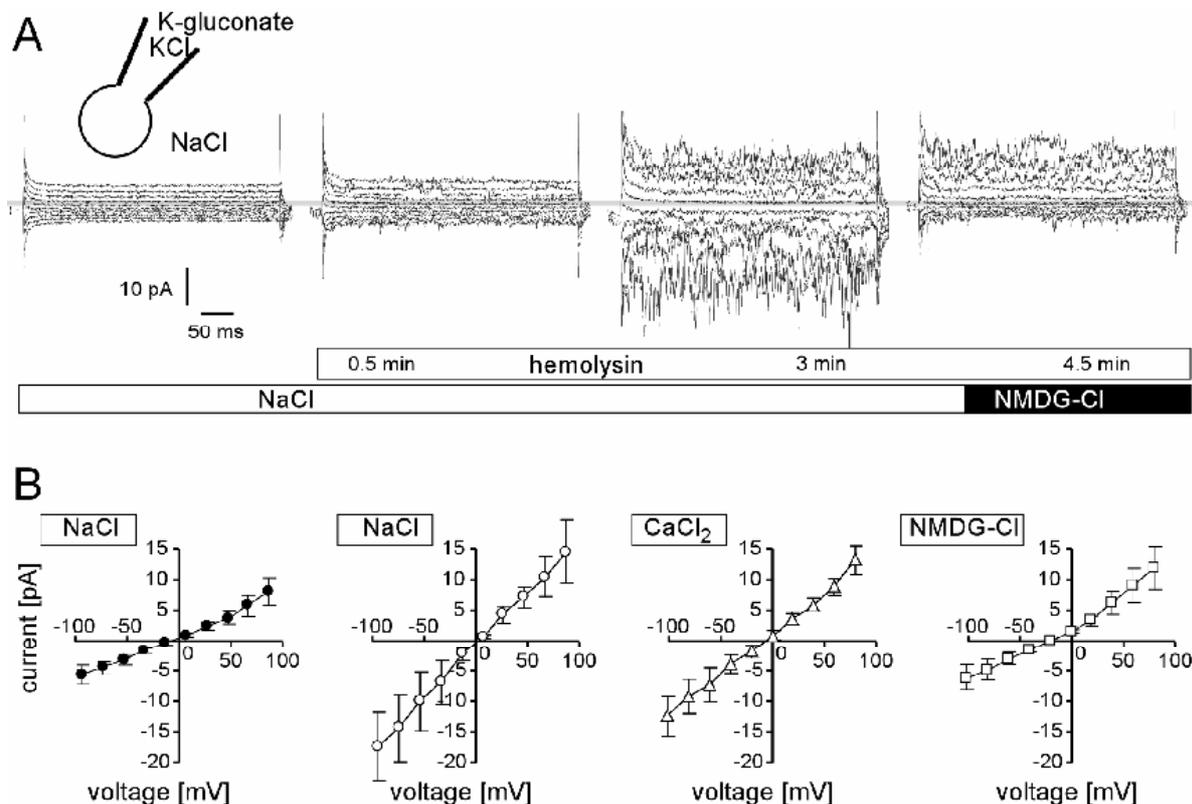


Abb. 30: Hämolysin-induzierte, unselektive Kationströme in menschlichen Erythrozyten.

Stromflüsse, gemessen in der whole-cell-Konfiguration mit KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung in Kombination mit NaCl-Standardspüllösung bzw. NMDG-Cl-Spüllösung. Die Zugabe von 0,1 U/ml Hämolysin Kanagawa zur Spüllösung (zweite bis vierte Abbildung) induzierte einen Anstieg der in dieser Konfiguration gemessenen Ströme (A). Mittlere, in der whole-cell-Konfiguration gemessene Strom/Spannungs-Beziehung ( $I/U$ ) der nicht mit Hämolysin stimulierten (gefüllte Kreise) und der mit 0,1 U/ml Hämolysin stimulierten (leere Kreise) Erythrozyten. Die Messungen erfolgten mit NaCl-, CaCl<sub>2</sub> oder NMDG-Cl-Spüllösung (Mittelwerte  $\pm$  SE;  $n=5-6$ ).

Eine Zugabe von 1 U/ml Hämolyisin Kanagawa zur NaCl-Spüllösung erhöhte zeitabhängig die gemessenen whole-cell-Ströme. Diese durch das Hämolyisin induzierten Ströme waren nichtselektiv und kationspezifisch, was aus folgenden Beobachtungen abgeleitet werden kann:

- Die induzierten Ströme kehrten sich, wenn mit der KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Spüllösung gemessen wurde, nahe bei einer Spannung von 0 V um.
- Wurde das extrazelluläre Natrium durch das größere Kation NMDG<sup>+</sup> ersetzt, so verringerten sich die gemessenen Einwärtsströme auf Werte, die sich nicht mehr von denen unterschieden, die in der Kontrolle gemessen werden konnten.  
Dies lässt sich dadurch erklären, dass die NMDG<sup>+</sup>-Ionen aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind, intakte Zellmembranen zu durchdringen. Außerdem verlagerte sich das Umkehrpotential auf die Spannung -20 mV.
- Bei Verwendung der hochkalziumhaltigen CaCl<sub>2</sub>-Spüllösung befanden sich die durch das Hämolyisin Kanagawa induzierten Einwärtsströme zwischen denen, die mit der NMDG-Cl-Spüllösung und der NaCl-Spüllösung gemessen worden waren. Dies legt eine Permeabilität für Kalziumionen der durch das Hämolyisin stimulierten Erythrozytenmembranen nahe.

#### **3.5.2 Durch das Hämolyisin Kanagawa induzierte Aktivierung des Gardos-Kanals**

Zuerst erfolgten Messungen der Stromspuren und der Strom/Spannungs-Relation in der whole-cell-Konfiguration mit KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Standardspüllösung unter Kontrollbedingungen, dann nach Zugabe des Kalzium-Ionophors Ionomycin in einer Konzentration von 1 µM zur Standardspüllösung.

### 3. Versuche und Ergebnisse

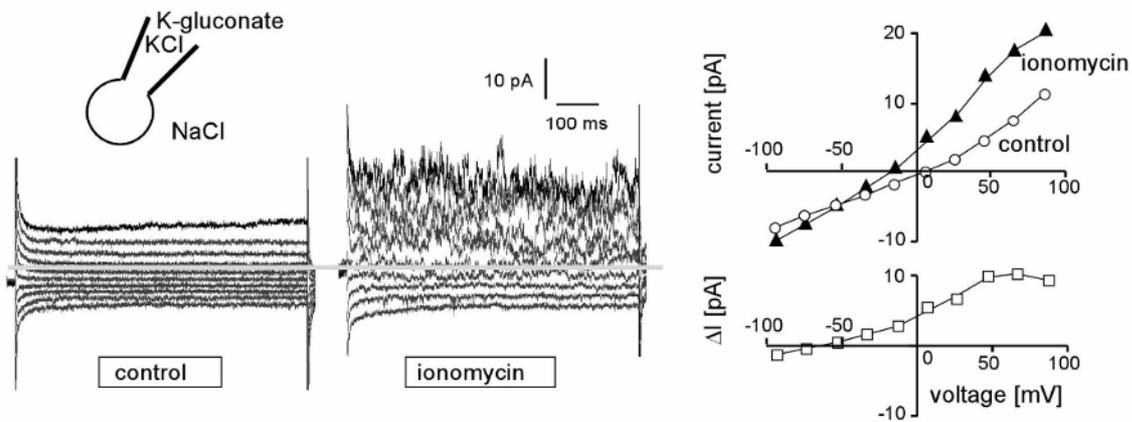


Abb. 31: Auswirkungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin auf die Stromkurven menschlicher Erythrozyten.

Stromspuren (erste zwei Abbildungen) und Strom-Spannungs-Relation (rechte obere Abbildung) menschlicher Erythrozyten, gemessen in der whole-cell-Konfiguration mit KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Standardspüllösung unter Kontrollbedingungen (linke Abbildung und leere Kreise rechte Abbildung) und nach Zugabe von  $1 \mu\text{l}$  des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin (zweite Abbildung und gefüllte Dreiecke). Zudem ist der durch das Ionomycin induzierte Anteil des Stroms dargestellt (rechte untere Abbildung).

Die Stimulation der Erythrozyten mit  $1 \mu\text{M}$  des Kalzium-Ionophors Ionomycin erhöhte die whole-cell-Auswärtsströme, die mit der KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung und der NaCl-Standardspüllösung gemessen worden waren. Der Anteil des durch das Ionomycin induzierten Stroms zeigte ein Umkehrpotential am  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential, was auf eine Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und für  $\text{K}^+$  permeablen Gardos-Kanal durch das Ionomycin hinweist.

Der nächste Schritt bestand nun darin, in der cell-attached-Konfiguration und unter Verwendung der KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Standardspüllösung die Stromamplituden-Spannungsrelation und bei  $-80 \text{ mV}$  die Stromspuren des Gardos-Kanals zu ermitteln.

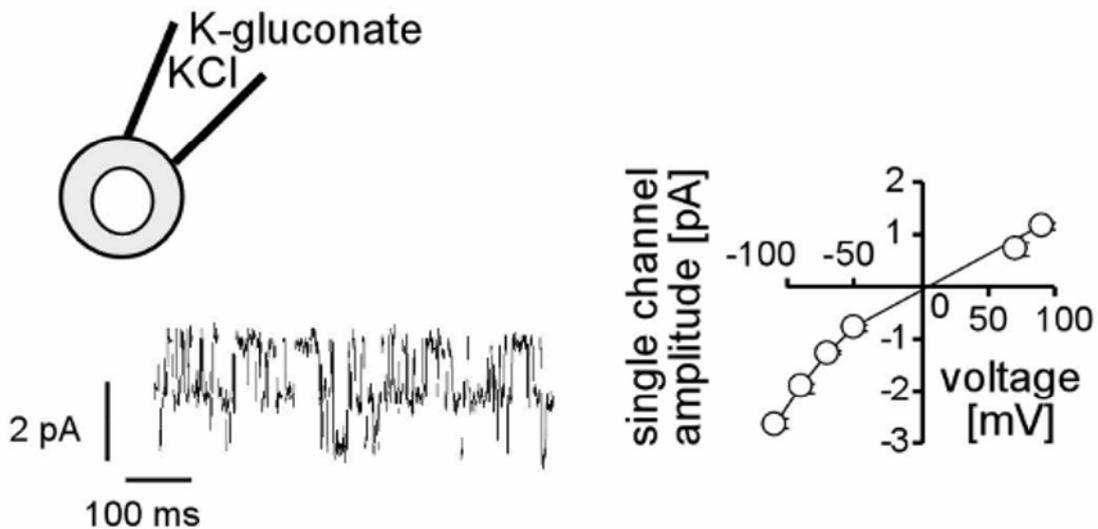


Abb. 32: Stromverhältnisse bei menschlichen Erythrozyten in der cell-attached Konfiguration. Stromkurve (bei  $-80$  mV, linke Abbildung) und Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n=3-6$ , rechte Abbildung) der in der cell-attached-Konfiguration gemessenen Amplituden-Spannungs-Relation des Einzelkanals unter Verwendung der KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Spüllösung.

Hierauf wurden, wiederum in der cell-attached-Konfiguration und mit den schon vorher verwendeten Lösungen, die Stromspuren gemessen, die sich vor und nach der Applikation von entweder  $1 \mu\text{M}$  Ionomycin oder  $1 \text{ U/ml}$  Hämolysin Kanagawa zur Spüllösung ergaben. So induzierte das Hämolysin einen Strom, der sehr demjenigen ähnelte, der bereits durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin hervorgerufen wurde.

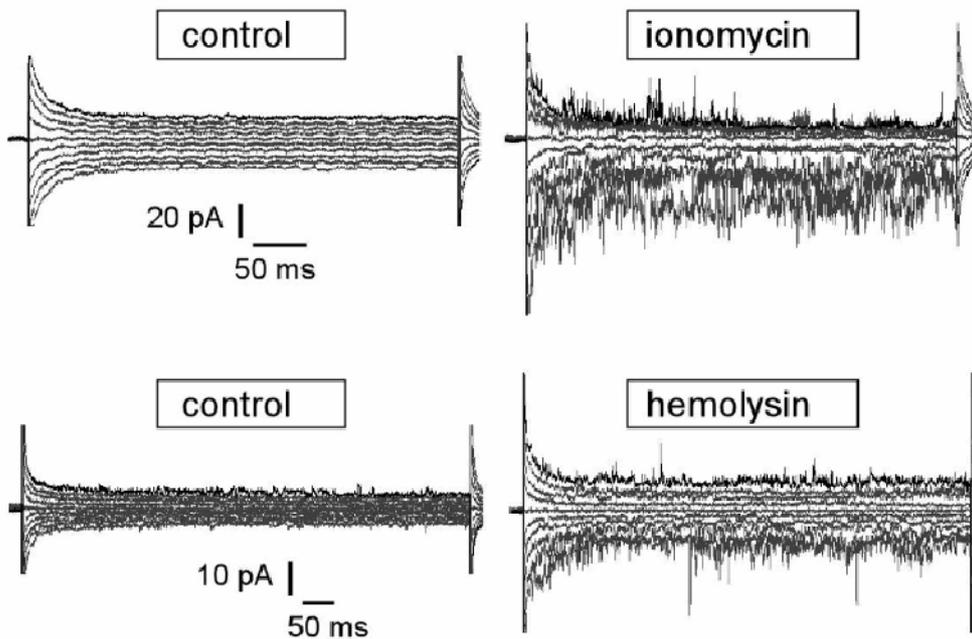


Abb. 33: Einfluss von Ionomycin bzw. Hämolyisin auf die Stromverhältnisse bei menschlichen Erythrozyten, gemessen in der cell-attached-Konfiguration.

In der cell-attached-Konfiguration gemessene Stromkurven unter Verwendung der KCl/K-Glukonat-Pipetten- und NaCl-Spüllösung mit und ohne Zusatz von entweder 1  $\mu$ M Ionomycin oder 1 U/ml Hämolyisin Kanagawa.

Zudem wurden die durchschnittlichen makroskopischen Ströme der Kontrolle und nach Zugabe von 1 U/ml Hämolyisin in Bezug zur Spannung ermittelt.

Nachdem dann noch derjenige gemittelte Anteil des induzierten Stroms bestimmt worden war, der allein auf die stimulierende Wirkung des Hämolyisins zurückgeführt werden konnte, wurde deutlich, dass dieser in gleicher Weise einwärts gleichrichtend ist, wie der durch eine Aktivierung des Gardos-Kanals zu Stande kommende Strom.

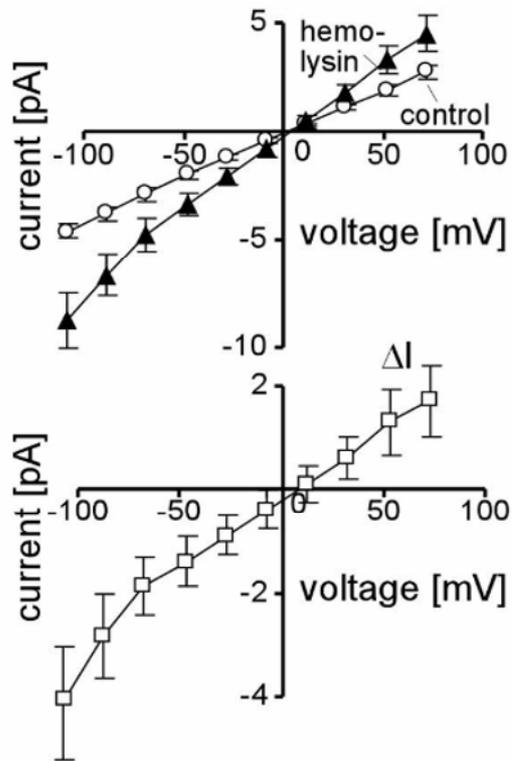


Abb. 34: Einfluss des Hämolytins auf die Stromverhältnisse, gemessen in der cell-attached-Konfiguration.

Mittelwerte  $\pm$  SE (n=6) der in der cell-attached-Konfiguration ermittelten Strom-Spannungs-Relationen unter Kontrollbedingungen (leere Kreise) und nach Zugabe von 1 U/ml Hämolytins Kanagawa (gefüllte Dreiecke). Des Weiteren sind die Mittelwerte  $\pm$  SE (n=6) der durch das Hämolytins Kanagawa induzierten Anteile am Gesamtstrom (leere Vierecke) dargestellt.

Ein Vergleich der Daten aus Abb. 32 und Abb. 34 lässt eine Hämolytins-induzierte Aktivierung von:

$$x \cdot P_0 = 1,5 \text{ Kanälen/Patch}$$

Gl. 3:

$x$  = Anzahl aktiver Kanäle

$P_0$  = mittlere Offenwahrscheinlichkeit

vermuten.

### 3. Versuche und Ergebnisse

Im letzten Teil dieses Versuchs wurde noch einmal die KCl/K-Glukonat-Pipettenlösung, kombiniert mit entweder kalziumhaltiger NaCl-Standardspüllösung oder kalziumfreier EGTA-Spüllösung, verwendet. Es wurden Messungen der Kontrollen ohne Hämolyysin und Messungen nach Inkubation mit 1 U/ml Hämolyysin vorgenommen.

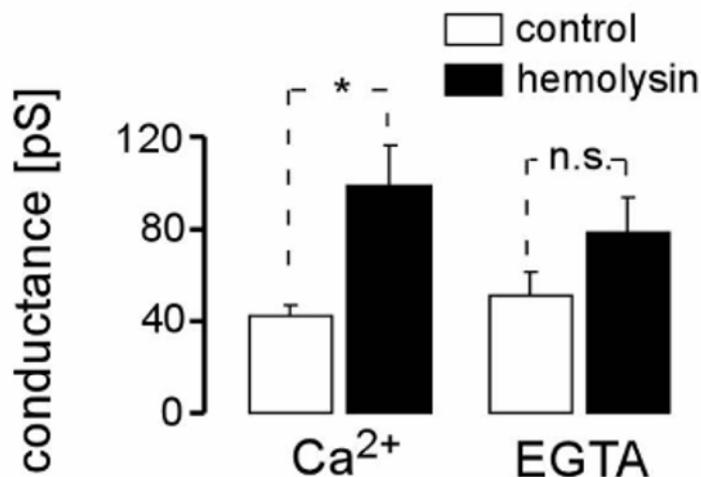


Abb. 35: Einfluss des Hämolyisins auf die Leitfähigkeit menschlicher Erythrozyten in Ca<sup>2+</sup>-haltiger und Ca<sup>2+</sup>-freier Lösung.

Mittelwerte  $\pm$  SE (n=5-6, ermittelt bei einer Spannung zwischen -60 und -100 mV) der gemessenen Einwärtsleitfähigkeiten von menschlichen Erythrozyten vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) Inkubation mit 1 U/ml Hämolyysin Kanagawa in Ca<sup>2+</sup>-haltiger NaCl-Spüllösung (Ca<sup>2+</sup>) oder in Ca<sup>2+</sup>-freier EGTA-Spüllösung (EGTA). Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen einer Inkubation mit Hämolyysin und ohne Hämolyysin (P = 0,0263; zweiseitiger Welch-t-Test) in der NaCl-Standardspüllösung. Dahingegen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen einer Inkubation mit und ohne Hämolyysin in der EGTA-Spüllösung.

Die mittlere Einwärtsleitfähigkeit zwischen -60 und -100 mV Spannung wurde gemessen und ergab eine Abhängigkeit der durch das Hämolyysin induzierten Aktivität des Kanals von der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. So konnte kein signifikanter Anstieg der makroskopischen Einwärtsleitfähigkeit nach Inkubation mit Hämolyysin in der kalziumfreien EGTA-Spüllösung festgestellt werden. In der kalziumhaltigen NaCl-Spüllösung hingegen erhöhte das Hämolyysin die Einwärtsleitfähigkeit signifikant.

### 3. Versuche und Ergebnisse

---

Zusammengenommen lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass das Hämolsin Kanagawa bei menschlichen Erythrozyten eine Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und die Kaliumpermeabilität erhöhenden Gardos-Kanals zur Folge hat.

Weiterhin ergibt sich eine Kalziumpermeabilität des durch das Hämolsin induzierten Stromes.

## 4 Interpretation und Diskussion

### 4.1 Auswirkungen der Hämolysexposition auf menschliche Erythrozyten

#### 4.1.1 Aktivierung eines Kationkanals

Diese Arbeit zeigt, dass das von *Vibrio parahaemolyticus* produzierte Hämolyisin Kanagawa oder auch thermostable direct hemolysin (TDH) bei menschlichen Erythrozyten zur Induktion eines Kationkanals führt.

Schon in früheren Studien [Huntley et al., 1993] wurde von folgender Leitfähigkeit berichtet:  $\text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+$ . Man hatte erwartet, dass die höhere Selektivität für  $\text{K}^+$  einer durch den Einstrom von  $\text{Na}^+$  durch für  $\text{Na}^+$ -selektive Kanäle bedingten Zellschwellung entgegenwirkt. Jetzt weiß man, dass das  $\text{K}^+$  darüber hinaus während des  $\text{Na}^+$ -Einstroms aus der Zelle ausströmt, um eine Erhöhung der intrazellulären Osmolarität und die dadurch bedingte Schwellung der Zelle zu vermeiden.

Wird das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  durch  $\text{NMDG}^+$  ersetzt, das nicht in der Lage ist, die Membran der Erythrozyten zu durchqueren, so führt der Verlust von intrazellulärem  $\text{K}^+$  über eine Hyperpolarisation und nachfolgenden  $\text{Cl}^-$ -Verlust zu einer noch ausgeprägteren Zellschrumpfung, da diese nicht durch einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom abgeschwächt oder sogar kompensiert werden kann. So zeigen die Messungen des Zellvolumens nach Inkubation mit Hämolyisin über 30 min eine deutliche Abnahme des Zellvolumens, über 10 h zeigen sich die Erythrozyten wieder leicht vergrößert. Im  $\text{NMDG}^+$ -haltigen und damit natriumfreien Medium zeigt sich die Schrumpfung nach 30minütiger Inkubation deutlich ausgeprägter, und die Schwellung nach 10stündiger Inkubation unterbleibt.

Menschliche Erythrozyten zeigen für  $\text{Ca}^{2+}$  permeable, nicht-selektive Kation-Leitfähigkeiten, die durch Spannung aktiviert [Halperin et al., 1989; Christophersen und Bennekou, 1991; Kaestner et al., 1999] und über das Zellvolumen und die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration reguliert werden [Huber et al., 2001].

Die durch diese Arbeit entdeckte und durch das Hämolyisin Kanagawa induzierte Permeabilität für Kationen unterscheidet sich von der bisher beobachtbaren endogenen Kationleitfähigkeit. So kommt es nach Exposition der Erythrozyten gegenüber dem

Hämolyse auch ohne vorherige Veränderungen sowohl des Zellvolumens als auch der  $\text{Cl}^-$ -Konzentration zu messbaren Veränderungen der Kationleitfähigkeit über die Membran.

Das Hämolyse Kanagawa ermöglicht ebenfalls über das Öffnen unselektiver Kationkanäle [Huber et al., 2001; Duranton et al., 2002] das Einströmen von  $\text{Ca}^{2+}$  in den Erythrozyten. Dass dieses einströmende  $\text{Ca}^{2+}$  ursächlich an der Zellschrumpfung beteiligt sein muss, zeigt die Messung des forward scatter in kalziumfreiem Medium nach Inkubation mit Hämolyse, da die zuvor in Standard-Ringer-Lösung beobachtete Zellschrumpfung nun ausbleibt.

Erythrozyten in kalziumhaltiger Spüllösung zeigen im patch-clamp signifikant gegenüber der Kontrolle erhöhte Einwärtsströme. Diese zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mehr, wenn die Messung in kalziumfreier EGTA-Spüllösung erfolgt. Daraus kann auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität des, durch das Hämolyse induzierten, Stromes geschlossen werden.

Weitere unspezifische Kationkanäle werden über eine Erhöhung der extrazellulären Osmolarität, also durch osmotischen Schock, durch Zugabe von *t*-Butylhydroperoxid (*t*-BHP) zur Auslösung von oxidativem Stress und durch Energiedepression über Entzug der extrazellulären Glucose, aktiviert [Lang et al., 2003b].

Damit spielen diese unspezifischen Kationkanäle über ihre Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  eine wichtige Rolle für die Induktion von Apoptose, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zum Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der Erythrozytenmembran mit nachfolgender Phagozytose durch Makrophagen führt [Lang et al., 2003b]. Die Phosphatidylserinasymmetrie geht auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der Scramblase zurück, wie sie bei Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten ist [Woon et al., 1999; Dekkers et al., 2002].

Des Weiteren ermöglicht das Hämolyse einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der groß genug ist um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal, den sogenannten Gardos-Kanal, zu aktivieren [Bookchin et al., 1987; Brugnara et al., 1993]. Dieser Kanal verstärkt den  $\text{K}^+$ -Ausstrom, womit seine Aktivierung durch die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität also ganz erheblich zu  $\text{K}^+$ -Verlust, Hyperpolarisation,  $\text{Cl}^-$ - und Wasserausstrom mit nachfolgender Zellschrumpfung beiträgt.

### 4.1.2 Aktivierung des Gardos-Kanals

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Hämolysexposition bewirkt unter anderem die Aktivierung eines  $\text{K}^+$ -Kanals, des sogenannten Gardos-Kanals.

Dies führt zu massivem  $\text{K}^+$ -Verlust, damit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, die der Erythrozyt mittels eines  $\text{Cl}^-$ -Ausstroms zu kompensieren versucht. Dem Chlorid folgt osmotisch Wasser nach, es ergibt sich eine Zellschrumpfung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das TDH bei epithelialen Zellen zu einer Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit anschließender Stimulation der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion führt [Raimondi et al., 1995; Tang et al., 1995; Fabbri et al., 1999; Takahashi et al., 2000a, b; 2001]. Hierbei ist der zytotoxische Effekt jedoch nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig [Tang et al., 1995].

Nach Inkubation der Erythrozyten mit Hämolyisin und dem spezifischen Gardos-Kanal-Blocker Clotrimazol [Jensen et al., 2001] kann die, durch den  $\text{K}^+$ -Ausstrom bedingte, Zellschrumpfung signifikant reduziert werden. Ebenfalls signifikant reduziert wird die Zellschrumpfung durch eine Erhöhung des extrazellulären  $\text{K}^+$ -Gehaltes und somit einer Reduktion des chemischen Gradienten für  $\text{K}^+$ . Dies bedeutet, dass das Kalium trotz einer Öffnung des Gardos-Kanals nicht aus der Zelle ausströmen und dies hyperpolarisieren kann.

Die Zellschrumpfung, die durch die Aktivierung des Gardos-Kanals zu Stande kommt, wird auch als Trigger für die Aktivierung der Scramblase angesehen. Dieses Enzym transloziert Phosphatidylserin, das normalerweise nur im inneren Blatt der Zellmembran vorkommt, auf die Membranaußenseite. Dies führt dazu, dass solche Zellen von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden.

Da die Zugabe von Clotrimazol oder auch die Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration nicht nur die Zellschrumpfung, sondern auch die Phosphatidylserinexposition deutlich reduziert, bestätigt dies eine Beteiligung des Gardos-Kanals an der erythrozytären Apoptose.

Auch die Messungen der  $\text{K}^+$ -Freisetzung zeigen eine signifikante Reduktion des Anteils an freigesetztem  $\text{K}^+$  an der gesamt freisetzbaren  $\text{K}^+$ -Menge, wenn mit Clotrimazol inkubiert und somit der Gardos-Kanal inhibiert wird.

Mittels des patch-clamp kann gezeigt werden, welche Auswirkungen das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin und der dadurch direkt ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auf die Spannungsverhältnisse bei menschlichen Erythrozyten hat. So bewirkt das Ionomycin eine

Erhöhung der Auswärtsströme, deren Umkehrpotential am  $K^+$ -Gleichgewichtspotential liegt, was auf eine Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen Gardos-Kanals hindeutet. Das Hämolyisin Kanagawa induziert einen Strom, der sehr demjenigen gleicht, der durch das Ionomycin hervorgerufen wird. Dies deutet ebenfalls sehr stark auf eine Aktivierung des Gardos-Kanals über den durch das Hämolyisin induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom hin.

Wie bereits erwähnt, wird die Zellschrumpfung durch  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung des Gardos-Kanals als Trigger für die Scramblase angesehen. Des Weiteren wird dieses Enzym auch direkt über eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch oben beschriebene unselektive Kationkanäle aktiviert und bewirkt die Erkennung der Zellen als apoptotisch.

### **4.1.3 Aktivierung der Scramblase und der Phosphatidylserin-Flip-Flop in Zusammenhang mit einer Apoptoseinduktion durch das Hämolyisin Kanagawa**

Das Hämolyisin Kanagawa bewirkt also bei menschlichen Erythrozyten eine unselektive Permeabilität für Kationen. Dies führt zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der zum einen die Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals, zum anderen die Aktivierung der Scramblase zur Folge hat. Die Scramblase wird direkt über den Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und indirekt, getriggert durch die Zellschrumpfung aufgrund des  $K^+$ -Verlusts durch den Gardos-Kanal, aktiviert. Letztendlich wird dieses Enzym nach dem Einwirken schädigender Einflüsse auf den Erythrozyten, die seine Apoptose zur Folge haben, wie etwa Energiedepression, oxidativen Stress, osmotischen Schock oder bakterielle Toxine über den daraus resultierenden  $Ca^{2+}$ -Einstrom, aktiviert.

So wurde bereits gezeigt, dass osmotischer Schock bei kernhaltigen Zellen Apoptose induziert [Rosette und Karin, 1996; Lang et al., 2002a].

Die Scramblase bewirkt die Translokation von im inneren Blatt der Membran vorkommendem Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite. Dies bewirkt zum Einen die Bindung an spezifische Phosphatidylserin-Rezeptoren von Makrophagen [Fadok et al., 2000; Messmer und Pfeilschifter, 2000; Henson et al., 2001], die hierdurch geschädigte Zellen erkennen und phagozytieren [McEvoy et al., 1986; Boas et al., 1998; Eda und Sherman, 2002], bevor es zur Lyse der Zelle mit nachfolgender entzündlicher Reaktion kommt.

Zum Anderen macht man sich dies zu Nutze, indem sich fluoreszenz-markiertes Annexin-V an das Phosphatidylserin bindet und somit apoptotische Zellen mittels der Durchflusszytometrie erfasst werden können.

Die 30minütige Inkubation der Erythrozyten mit Hämolyisin Kanagawa führt zu einer signifikanten Erhöhung der Phosphatidylserin-exponierenden, Annexin-positiven, also apoptotischen Zellen. Höhere Konzentrationen des Hämolyisins führen zu einer erhöhten Rate apoptotischer Zellen, auch nach 10stündiger Inkubation bleibt der Anteil Annexin-positiver Zellen konstant. Hierdurch bestätigt sich, dass die sich wieder erhöhenden forward scatter Werte nach 10stündiger Inkubation lediglich durch eine osmotische Schwellung aufgrund eines  $\text{Na}^+$ -Einstroms der bereits apoptotischen Zellen bedingt ist und keinen Einfluss mehr auf den programmierten Zelltod hat. Das Hämolyisin induziert also in konzentrationsabhängiger Weise die Apoptose des Erythrozyten.

Ersetzt man das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  durch das große Kation NMDG<sup>+</sup>, so hat dies keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate. Insofern spielt das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  keine Rolle für die Wirkung des Hämolyisins auf die Apoptoseinduktion, sondern lediglich auf den osmotischen Ausgleich der durch den  $\text{K}^+$ -Ausstrom bedingten Zellschrumpfung.

Sowohl erhöhte extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentrationen, wie auch Zusatz des Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol senken signifikant die Apoptoserate von mit Hämolyisin inkubierten Erythrozyten, was den Schluss zulässt, dass die durch das Hämolyisin induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit, Aktivierung des Gardos-Kanals, Zellschrumpfung und Phosphatidylserinexposition direkt in ursächlichem Zusammenhang mit der Apoptose stehen. Vor zwei Jahrzehnten wurde bereits gezeigt, dass durch hypotones Medium ausgelöste Hämolyse menschlicher Erythrozyten den Verlust der Phospholipidasymmetrie der *ghost*-Membran in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Weise induziert [Williamson et al., 1985].

Dieser Verlust der Membranasymmetrie unterscheidet sich jedoch deutlich von dem in dieser Arbeit beobachtbaren Effekt des Hämolyisins auf die Erythrozytenmembran. Hier erfolgt die Induktion des Phosphatidylserin-Flip-Flop durch das Hämolyisin und damit auch die Annexin-Bindung bei intakten, lebenden Erythrozyten. Es kommt bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen des Hämolyisins und den niedrigen Inkubationszeiten nur zu geringer Hämolyse, da das Hämolyisin in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise die Hämolyse der Erythrozyten bewirkt.

Erst vor kurzer Zeit konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten, die mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin behandelt werden, Zellschrumpfung, Zerstückelung der Membran und

Verlust der Membranasymmetrie erfahren [Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001; Lang et al., 2003b]. Daraus konnte geschlossen werden, dass ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Apoptose bei Erythrozyten induziert. Das Kalzium strömt auf schädigende Einflüsse hin durch die bereits beschriebenen unselektiven Kationkanäle in die Zelle ein und löst damit das Selbstmordprogramm mit den Folgen der Zellschrumpfung und dem Verlust der Membranasymmetrie aus.

Obwohl das Hämolyisin nicht zur substantiellen Zellschrumpfung führt, begünstigt die Translokation des Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite geschädigter Erythrozyten dennoch die Bindung an für Phosphatidylserin spezifische Rezeptoren [Fadok et al., 2000; Messmer und Pfeilschifter, 2000; Henson et al., 2001] auf Makrophagen. Dies hat deren Elimination durch Phagozytose zur Folge [McEvoy et al., 1986; Boas et al., 1998; Eda und Sherman, 2002].

Man ist geneigt zu spekulieren, dass dieser Mechanismus die Beseitigung geschädigter Erythrozyten gestattet, bevor es zur Hämolyse kommt. Somit wird eine Hämoglobinfreisetzung ins Plasma, die sowohl die Mikrozirkulation als auch die Nierenfunktion beeinträchtigen würde, verhindert [Lim et al., 1998; 2000].

Da Erythrozyten weder einen Zellkern noch Mitochondrien besitzen, können sie keine anderen die Apoptose widerspiegelnden strukturellen Veränderungen wie etwa die DNA-Fragmentation oder die Depolarisation der mitochondrialen Membran darbieten [Green und Reed, 1998; Gulbins et al., 2000].

Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass das TDH von *Vibrio parahaemolyticus* DNA-Fragmentation bei Rat-1 Zellen induziert [Naim et al., 2001a, b]. Darüber hinaus nimmt man an, dass der Verlust an intrazellulärem  $\text{K}^+$  bei manchen Zelltypen als notwendige Bedingung für Apoptose anzusehen ist. So wird die Apoptose bei Lymphozyten unter Versuchsbedingungen, die die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration vermindern, verstärkt. Wird der  $\text{K}^+$ -Ausstrom blockiert, so kommt es zur Hemmung der Apoptose [Bortner et al., 1997; Montague et al., 1999].

So scheint die Reduktion der intrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration ein notwendiges und frühes Ereignis im Rahmen des programmierten Zelltodes zu sein [Hughes et al., 1997; Hughes und Cidlowski, 1999]. Eng hieran gebunden sind Zellschrumpfung,  $\text{K}^+$ -Ausstrom und Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential. Diese treten jedoch unabhängig von der DNA-Fragmentation auf und sind weitgehend Caspasen-unabhängig [Bortner und Cidlowski, 1999].

Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Proteinkinase C in der Lage ist, die durch den Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose über die Modulation des  $K^+$ -Verlustes und die Zellschrumpfung zu inhibieren [Gomez-Angelats et al., 2000].

Ähnlich den Lymphozyten scheint der  $K^+$ -Ausstrom ebenfalls während der Anfangsphase des programmierten Zelltodes bei Oozyten und Granulosazellen aufzutreten [Perez et al., 2000].

In jedem Fall spielt der, durch die Aktivierung  $Ca^{2+}$ -sensitiver  $K^+$ -Kanäle ausgelöste, Verlust an intrazellulärem Kalzium eine wichtige Rolle in der Auslösung der erythrozytären Apoptose nach Hämolysexposition.

### **4.1.4 Möglichkeiten, modulatorisch Einfluss auf die durch Hämolyisin Kanagawa induzierte Apoptose zu nehmen**

Eine Hemmung der Apoptose, die durch das Hämolyisin Kanagawa induziert wird, ist an verschiedenen Punkten des Signalweges möglich.

Der erste Ansatzpunkt stellt die durch das Hämolyisin induzierte Leitfähigkeit für  $Ca^{2+}$  dar. Nach Inkubation der Erythrozyten mit Hämolyisin Kanagawa in kalziumfreiem EGTA-Medium unterbleibt die bei in Standardspüllösung inkubierten Erythrozyten durchaus messbare Leitfähigkeit für  $Ca^{2+}$ . Als Folge des reduzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms kommt es trotz Hämolysexposition nicht zur Schrumpfung der Erythrozyten im forward scatter, verglichen mit denen, die in Standard-Ringer-Lösung mit dem Hämolyisin inkubiert werden.

Der zweite Ansatzpunkt stellt der durch die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktivierte Gardos-Kanal dar. Wie in dieser Arbeit deutlich ersichtlich wird, bewirkt seine Hemmung mittels des spezifischen Blockers Clotrimazol eine signifikante Reduktion von sowohl der Zellschrumpfung im forward scatter als auch der Rate der Annexin-bindenden und somit apoptotischen Zellen nach Hämolysexposition. Die Inhibition der Zellschrumpfung erklärt sich über die direkte Hemmung des  $K^+$ -Ausstroms, wodurch es nicht zur Hyperpolarisation mit  $Cl^-$ - und Wasserausstrom kommt. Die Reduktion der Rate apoptotischer Zellen ergibt sich dadurch, dass die Zellschrumpfung als Trigger für die Aktivierung der Scramblase angesehen wird. Diese Aktivierung unterbleibt also ebenfalls.

Ein weiterer Blocker des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals stellt das Charybdotoxin, ein Skorpiongift, dar. Dieses blockt in gleicher Weise wie das Clotrimazol sowohl Annexin-Bindung als auch Zellschrumpfung [Lang et al., 2003d].

Dritter Ansatzpunkt für eine Hemmung der Apoptose liegt darin, den  $\text{K}^+$ -Ausstrom nicht über eine Hemmung des Gardos-Kanals, sondern über die Abschwächung des chemischen Gradienten für  $\text{K}^+$  zu blockieren. Dies wird durch die Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration auf 29 mM bzw. 125 mM erreicht. Auch in diesen Versuchen zeigt sich eine gegenüber den Ansätzen in Standard-Ringer-Lösung deutlich verminderte Zellschrumpfung und eine signifikant reduzierte Rate an apoptotischen Zellen, jeweils nach Hämolysexposition.

Den vierten Ansatzpunkt stellt der  $\text{Cl}^-$ -Verlust des Erythrozyten mit nachfolgendem Wasserausstrom und Zellschrumpfung dar. Der  $\text{Cl}^-$ -Kanal-Blocker NPPB ist nach Apoptoseinduktion mittels Ionomycin in der Lage, sowohl die Zellschrumpfung als auch die Annexin-Bindung zu verhindern. Damit spielen die  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sicherlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose. Genaue Mechanismen sind allerdings noch unklar [Myssina et al., 2004].

Der fünfte Ansatzpunkt liegt in einer Hemmung der Scramblase und damit des Phosphatidylserin-Flip-Flops. Darauf wird in dieser Arbeit allerdings nicht näher eingegangen, zumal es fraglich ist, ob damit die Apoptose verhindert werden könnte, oder ob lediglich die Phagozytose durch Makrophagen inhibiert würde.

Eine Sensibilisierung der Zellen für Apoptose findet sich bei Erythrozyten, deren Zytosol durch eine vorhergehende Schwellung in hypotonem Medium verdünnt wurde. Bei diesen Zellen findet sich eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Empfindlichkeit in Bezug auf den Verlust der Phospholipid-Membranasymmetrie [Williamson et al., 1985].

### 4.2 Sepsis – Anämie – Erythrozytenapoptose

#### 4.2.1 Sepsis

Die Sepsis ist eine ernstzunehmende Erkrankung, hervorgerufen durch eine außer Kontrolle geratene Infektion mit in die Blutbahn eingedrungenen toxinproduzierenden Bakterien. Die Sepsis kann ihren Ursprung an jeder Stelle des Körpers haben und geht von einer zunächst lokal begrenzten Infektion, einem septischen Herd, aus. Dies sind meist Infektionen des Harn- oder Verdauungstraktes, der Leber oder der Gallenblase, der Haut oder der Lungen. Die Entstehung einer Sepsis kann auch iatrogen durch Venenverweilkatheter, Drainagen oder lagerungsbedingte Ulzerationen begünstigt werden. Kann diese Infektion nun durch den Organismus nicht mehr auf den Ursprungsort begrenzt gehalten werden, so lösen die Toxine der Erreger Entzündungsreaktionen in allen Organen des Körpers aus, womit sich das Immunsystem letzten Endes gegen den Kranken selbst wendet. Es droht ein Multiorganversagen, intensivmedizinische Versorgung bietet die einzige Überlebenschance [Buchta et al., 2002, S. 251-253].

Das Vollbild der Sepsis besteht im sogenannten systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Die Kriterien für dieses Syndrom sind eine Temperaturerhöhung über 38°C oder eine Temperaturabsenkung unter 36°C, Schüttelfrost, des Weiteren eine Tachy- oder Bradykardie, eine Tachypnoe über 20/min, eine respiratorische Alkalose mit pCO<sub>2</sub> unter 32 mmHg, Leukozyten über 12000/µl mit Erhöhung des Anteils Stabkerniger auf über 10%, Thrombozytopenie und eine Absenkung des Antithrombin III (ATIII) [Herold et al., 2004, S. 266-270; Buchta et al., 2002, S. 251-253, S. 819].

Besonders bei Intensivpatienten und bereits anderweitig immunsupprimierten Patienten stellt die Sepsis eine akut lebensbedrohliche Erkrankung dar. Häufige Komplikationen sind septischer Endotoxinschock, Multiorganversagen bedingt durch den Ausfall mindestens zweier lebenswichtiger Organsysteme, Verbrauchskoagulopathie und Absiedlungen in den einzelnen Organen mit nachfolgender Herdenzephalitis, Endocarditis ulcerosa, septischer Arthritis oder auch einer Osteomyelitis [Buchta et al., 2002, S. 251-253].

Pathophysiologisch kommt es zu überhöhter Zytokinausschüttung und NO-Produktion mit Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes und Tachykardie. Dies bewirkt Mikrozirkulationsstörungen, Ödembildung aufgrund einer gestörten Gefäßpermeabilität,

disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) durch gleichzeitige Aktivierung von Gerinnungssystem und Fibrinolyse und einen Abfall der Sauerstoffsättigung. Weitere Symptome sind Folge der Organschädigungen wie etwa eine verminderte Harnausscheidung, Verwirrtheit oder Delir und veränderte Nierenfunktionswerte. Eine auf Bakterien positiv getestete Blutkultur ist nicht obligat, aber in den meisten Fällen nachweisbar. Besonders für diese Arbeit von Interesse ist die sich unter einem SIRS oder in der Sepsis entwickelnde Anämie, die der Organismus zwar teilweise durch eine Erhöhung des Erythropoietinspiegels zu kompensieren versucht, aber trotzdem nicht kontrolliert werden kann [Buchta et al., 2002, S. 251-253, S. 819; Herold et al., 2004, S. 266-270; Mammen 1998; Krasnik et al., 1999; Krafft-Jacobs und Bock, 1996; Soboleva et al., 1993; Mesters et al., 1996; McGilvray und Rotstein, 1998].

In den USA erkranken jährlich 751000 Menschen an einer Sepsis, das sind 3 von 1000 Menschen oder 2 von 100 Krankenhauspatienten, wobei 44,5% der Patienten vorher gesund und nicht bereits in medizinischer Behandlung gewesen sind. Das mittlere Alter dieser Patienten beträgt 64 Jahre, und mit einem Anteil von 9,3% an den gesamten Todesfällen stellt die Sepsis eine häufigere Todesursache als den akuten Herzinfarkt dar. Die Behandlungskosten für diese Patienten betragen 17 Milliarden Dollar. Die Mortalität liegt bei 30% [Angus et al., 2001; Angus und Wax, 2001; Sessler und Shephard, 2002].

Die Therapie der Sepsis besteht in einer Sanierung der infektiösen Herde entweder durch kombinierte chirurgische und medikamentöse Therapie oder durch alleinige antibiotische Behandlung, die auf den isolierten Erreger abgestimmt sein sollte. Ebenfalls sehr wichtig ist die adäquate symptomatische Behandlung sowie die Behandlung der lebensbedrohlichen Komplikationen durch Katecholamingabe, Volumensubstitution, Beatmung, Cortisongabe, Hämofiltration, Gabe von Protein c und Therapie der Anämie [Buchta et al., 2002, S. 251-253, S. 219; Herold et al., 2004, S. 266-270; Sessler und Shephard, 2002].

Da bei der Sepsis ein Zusammenwirken verschiedenster, und jede für sich allein schon ungünstige, Stoffwechsellentgleisungen für den meist fatalen Ausgang verantwortlich ist, kommt der Kontrolle jedes einzelnen Parameters eine ungeheure Bedeutung zu. So gilt es unter Anderem, die Anämie bei Sepsispatienten äthiologisch zu klären und auch hier therapeutisch anzusetzen [Lynn und Cohen, 1995].

### **4.2.2 Anämie, möglicherweise bedingt durch Apoptoseinduktion der zirkulierenden Bakterientoxine**

Da mit dieser Arbeit nachgewiesen wird, dass ein Bakterientoxin, in diesem Fall das von *Vibrio parahaemolyticus* produzierte Hämolysin Kanagawa, Apoptose bei Erythrozyten induziert, scheint es nur wahrscheinlich, dass für die Anämie während der Sepsis ebenfalls der programmierte Selbstmord der Erythrozyten eine entscheidende Rolle spielt, bedenkt man, dass hier verschiedenste Bakterientoxine in der Blutbahn zirkulieren.

Weil es während der Sepsis und noch mehr im septischen Schock zu einer kritischen Verminderung der Mikrozirkulation mit Sauerstoff-Mangelversorgung der einzelnen Organsysteme kommt, ist es besonders wichtig, die Anämie, also den Verlust der eigentlichen Sauerstoffträger, aufzuhalten, und somit einem Multiorganversagen mit letalem Ausgang vorzubeugen. Da es durchaus möglich ist, dass die Anämie durch Apoptose der Erythrozyten mitverursacht wird, bieten sich hier therapeutische Ansatzmöglichkeiten, indem antiapoptotisch eingegriffen wird. So wirkt Clotrimazol, der spezifische Blocker des Gardos-Kanals, durchaus auch *in vivo* antiapoptotisch.

### **4.2.3 Vorteile der Erythrozytenapoptose gegenüber der Hämolyse**

Werden die Erythrozyten unter Toxineinwirkung unkontrolliert hämolysiert, so hat dies äußerst negative Konsequenzen für den Organismus.

Das freiwerdende Hämoglobin führt zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation, was besonders im Fall der Sepsis, bei der die Durchblutung der Organe bereits schon nicht mehr ausreichend ist, zur Verschlimmerung der Situation beiträgt. So wird sowohl die Nierenfunktion durch freies Hämoglobin beeinträchtigt, als Komplikation droht das akute renale Nierenversagen, als auch die Funktionsfähigkeit des Pancreas. Bei diesem reichen die Folgen der Belastung durch freies Hämoglobin von einem diffusen Ödem bis zur akuten Pancreatitis mit fokalen Nekrosen [Lim et al., 1998; 2000; Herold et al., 2004, S. 266-270; Druml et al., 1991].

Die spontane Hämolyse der Erythrozyten führt darüber hinaus zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Der Organismus reagiert darauf mit einer inflammatorischen Reaktion und einer Aktivierung der intravasalen Gerinnung [Druml et al., 1991].

Auch dies ist in der Situation der Sepsis mit bereits systemisch ausgebreiteten Entzündungsreaktionen nicht sehr hilfreich.

Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, die durch das Hämolsin geschädigten Erythrozyten kontrolliert im Rahmen des programmierten Selbstmordes mit anschließender Phagozytose durch Makrophagen zu eliminieren. Hierbei unterbleiben sowohl die schädliche Hämoglobinfreisetzung als auch die Freisetzung anderer intrazellulärer Moleküle, die ihrerseits wiederum ein Freiwerden proinflammatorisch wirksamer Mediatoren begünstigen würden.

### **4.3 Rolle der Apoptose im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder und modulatorische Eingriffsmöglichkeiten**

Anämien spielen im Rahmen vieler Krankheitsbilder eine Rolle. Bei septischen Patienten wird eine Anämie beobachtet, die durchaus mittels Apoptose der Erythrozyten zustande kommen kann. Hierbei therapeutisch anzusetzen und somit positiv auf die Sauerstoffversorgung der einzelnen Organsysteme zur Vermeidung des Multiorganversagens einzuwirken, sollte Ziel weiterer Studien sein.

Es wurde festgestellt, dass Erythrozyten von Patienten mit chronischem Nierenversagen und somit stark erhöhten Harnstoffwerten im Serum signifikant mehr Phosphatidylserin präsentieren und somit als apoptotisch anzusehen sind [Bonomini et al., 1999].

Anämien bei Dialysepatienten mit Nierenversagen werden bereits mit Erythropoietin therapiert, das über die Hemmung der unselektiven Kationkanäle die Apoptose bei Erythrozyten verhindert und somit nicht nur über eine gesteigerte Neubildungsrate zur Erhöhung deren Lebensdauer beiträgt [Myssina et al., 2003].

Da sich bei Erythrozyten von Taurin-Transporter Knockout-Mäusen eine deutlich reduzierte Annexin-Bindung und eine weniger starke Zellschrumpfung nach Exposition gegenüber osmotischem Schock und oxidativem Stress findet als bei vergleichbaren Wildtyp-

Mäusen, geht man davon aus, dass Mäuse, die nicht über diesen Taurin-Transporter verfügen, wesentlich resistenter gegenüber Apoptose sind [Lang et al., 2003e]. Auch hier dürften sich für die Zukunft interessante Eingriffsmöglichkeiten in den Ablauf der erythrozytären Apoptose ergeben.

Mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten öffnen ebenfalls unselektive Kationkanäle, wahrscheinlich als Folge des durch den Erreger induzierten oxidativen Stress. Die Folge davon sind zum Einen ein Einstrom für das Überleben des Erregers wichtiger Substanzen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$ , zum Anderen wieder einmal die Aktivierung der Scramblase und der Phosphatidylserin-Flip-Flop zur Membranaußenseite. Somit können infizierte Zellen zumindest teilweise durch den Wirt erkannt und eliminiert werden [Lang et al., 2004c]. Sollte es möglich sein, die befallenen Zellen Malariainfizierter gezielt sensibler für Apoptose zu machen, so wäre der Organismus durchaus leichter in der Lage, die Infektion zu bekämpfen.

Entzug von Phosphat führt unter anderem zur Anämie. Experimente an Mauserythrozyten, von denen einige für 4 Tage unter niedrigen Phosphatbedingungen kultiviert wurden, zeigen, dass die Zellen unter der Phosphat-Diät wesentlich empfindlicher auf Stressfaktoren wie osmotischen Schock oder Entzug des extrazellulären  $\text{Cl}^-$  reagieren. Dies äußert sich in gesteigerter Zellschrumpfung und Annexin-Bindung und somit in vermehrter Phagozytose durch Makrophagen und letztendlich in einer Anämie [Birka et al., 2004].

Die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle spielt auch eine große Rolle für Zellschrumpfung und Verformung deoxygenierter Sichelzellen. Die Zellschrumpfung nach Aktivierung des Gardos-Kanals führt zu einer Konzentrierung des nicht normalen Hämoglobins und fördert dadurch die Sichelung [Bookchin et al., 1987; Lew und Bookchin, 1991; Brugnara et al., 1993; Joiner, 1993; Franco et al., 1996]. Somit sind Sichelzell-Erythrozyten sensibler gegenüber einer Apoptoseinduktion [Lang et al., 2002b], was unter Umständen auch für die Vorteile der Sichelzell-Heterozygoten gegenüber Nicht-Sichelzell-Genträgern in Bezug auf eine Malariainfektion verantwortlich sein kann. Möglicherweise werden bei den Heterozygoten Sichelzell-Genträgern die infizierten Erythrozyten früher durch Apoptose und Phagozytose eliminiert.

## 5 Zusammenfassung

Das Hämolysin Kanagawa, oder auch thermostable direct hemolysin (TDH), produziert von *Vibrio parahaemolyticus*, war bislang als Auslöser für Hämolyse bei menschlichen Erythrozyten bekannt. Flussstudien zeigten, dass es einen Kationkanal induziert.

Inhalt dieser Arbeit ist zum Einen die genaue Entschlüsselung der Kanaleigenschaften mittels des patch-clamp Verfahrens, zum Anderen die Klärung der funktionellen Bedeutung dieses Kationkanals und der durch diesen induzierten Ionenflüsse unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie oder auch fluorescence activated cell sorting (FACS).

Inkubation der Erythrozyten mit 1 U/ml des Hämolysins führt bereits nach wenigen Minuten zu einer unselektiven Kationpermeabilität der Membran. Darüber hinaus aktiviert das Hämolysin durch Clotrimazol hemmbare  $K^+$ -Kanäle, was auf eine Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen Gardos-Kanals hindeutet.

Innerhalb von 5 min führen 1 U/ml des Hämolysins bereits zu mäßiger Zellschrumpfung, die in kalziumfreiem Medium aufgehoben ist.

Erythrozyten, die mit 0,1 U/ml des Hämolysins behandelt werden, erfahren innerhalb von 60 min keine signifikante Hämolyse.

Wird das extrazelluläre  $Na^+$  durch  $NMDG^+$  ersetzt, so führt dies zu einer leichten Zellschrumpfung, die durch Zusatz von 0,1 U/ml Hämolysin vervielfacht wird.

Wie aus der Rate der Annexin-positiven Zellen ersichtlich wird, bewirkt eine 30minütige Inkubation mit 0,1 U/ml Hämolysin einen Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie der Zellmembran, was als typische Begleiterscheinung apoptotischer Zellen gewertet werden kann.

Sowohl die Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration, als auch die Zugabe des spezifischen Gardos-Kanal-Blockers Clotrimazol verringert signifikant die Rate der Annexin-bindenden Zellen.

Zusammenfassend lässt dies darauf schließen, dass das Hämolysin Kanagawa eine Kationpermeabilität induziert und endogene Gardos-Kanäle aktiviert. Als Konsequenz davon kommt es zum Verlust der Phosphatidylserinasymmetrie, die zumindest teilweise auf den  $K^+$ -Ausstrom durch den Gardos-Kanal zurückzuführen ist.

## 6 Literaturverzeichnis

Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes Alnemri, T., Alnemri, E.S. (1997)

CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FASL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP

*Cancer Res*, 57, 615-619

Aidley, D.J., Stanfield, P.R. (1996)

Ion Channels: Molecules In Action

*Cambridge University Press*

Alam, M.J., Miyoshi, S.I., Shinoda, S. (2003)

Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan

*Env Microbiol*, 5, 706-710

Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M. (1990)

Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers

*J Biol Chem*, 265, 4923-4928

Andree, H.A., Stuart, M.C., Hermens, W.T., Reutelingsperger, C.P., Hemker, H.C., Frederik, P.M., Willems, G.M. (1992)

Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect

*J Biol Chem*, 267, 17907-17912

Anfinogenova, Y.J., Rodriguez, X., Grygorczyk, R., Adragna, N.C., Lauf, P.K., Hamet, P., Orlov, S.N. (2001)

Swelling-induced  $K^+$  fluxes in vascular smooth muscle cells are mediated by charybdotoxin-sensitive  $K^+$  channels

*Cell Physiol Biochem*, 11, 295-310

Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R. (2001)

Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care

*Crit Care Med*, 29, 1472-1474

Angus, D.C., Wax, R.S. (2001)

Epidemiology of sepsis: an update

*Crit Care Med*, 29, S109-S116

Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. (1990)

Apoptosis. The role of the endonuclease

*Am J Pathol*, 136, 593-608

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998)

Death receptors: signaling and modulation

*Science*, 281, 1305-1308

Baba, K., Yamasaki, S., Nishibuchi, M., and Takeda, Y. (1992)

Examination by site-directed mutagenesis of the amino acid residues of the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* required for its hemolytic activity

*Microb Pathog*, 12, 279-287

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.J., Broger, C., Loetscher, H., Lesslauer, W. (1993)

Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF $\beta$  complex: implications for TNF receptor activation

*Cell*, 73, 431-445

Barry, P.H., and Lynch, J.W. (1991)

Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis

*J Membr Biol*, 121, 101-117

Bassé, F., Stout, J.G., Sims, P.J., Wiedmer, T. (1996)

Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transbilayer movement of phospholipid

*J Biol Chem*, 271, 17205-17210

Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A., Duke, R.C. (1995)

A role for CD95 ligand in preventing graft rejection

*Nature*, 337, 630-632

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, 1197-1206

Berkowitz, L.R., Orringer, E.P. (1984)

An analysis of the mechanism by which cetedil inhibits the Gardos phenomenon

*Am J Hematol*, 17, 217-223

Beutler, B., van Huffel, C. (1994)

Unraveling function in the TNF ligand and receptor families

*Science*, 264, 667-668

Birka, C., Lang, P.A., Kempe, D.S., Hoefling, L., Tanneur, V., Duranton, C., Nammi, S., Henke, G., Myssina, S., Krikov, M., Huber, S.M., Wieder, T., Lang, F. (2004)

Enhanced susceptibility to erythrocyte „apoptosis“ following phosphate depletion.

*Pflugers Arch*, 448, 471-477

Boas, F.E., Forman, L., and Beutler, E. (1998)

Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia

*Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 3077-3081

- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. (1996)  
Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death  
*Cell*, 85, 803-815
- Bonomini, M., Sirolli, V., Settefrati, N., Dottori, S., Di Liberato, L., Arduini A. (1999)  
Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure  
*J Am Soc Nephrol*, 10, 1982-1990
- Bookchin, R.M., Ortiz, O.E., and Lew, V.L. (1987)  
Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red blood cells  
*Prog Clin Biol Res*, 240, 193-200
- Bortner, C.D., and 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, 21953-21962
- Bortner, C.D., Hughes, F.M., Jr, and 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, 32436-32442
- Bose, R., Verheij, M., Haimovitz Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z., Kolesnick, R. (1995)  
Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals  
*Cell*, 82, 405-414
- 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, 1143-1156

Brugnara, C., de Franceschi, L., and 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, 520-526

Brugnara, C., Gee, B., Armsby, C.C., Kurth, S., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S.L., Platt, O.S. (1996)

Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease

*J Clin Invest*, 97, 1227-1234

Brugnara, C. (1997)

Erythrocyte membrane transport physiology

*Curr Opin Hematol*, 4, 122-127

Buchta, M., Höper, D.W., Sönnichsen, A. (Hrsg.) (2002)

Das zweite STEX – Basiswissen Klinische Medizin für Examen und Praxis

*Springer-Verlag, Heidelberg*, **1., unkorrigierte Auflage**: S. 251-253, S. 819

Cherwonogrodzky, J.W., and Clark, A.G. (1981)

Effect of pH on the production of the Kanagawa hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus*

*Infect Immun*, 34, 115-119

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M. Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1996)

Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95

*Science*, 274, 990-992

Christophersen, P., and Bennekou, P. (1991)

Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane.

*Biochem Biophys Acta*, 1065, 103-106

Chun, D., Chung, J.K., Tak, R., and Seol, S.Y. (1975)

Nature of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*

*Infect Immun*, 12, 81-87

Cifone, M.G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G., Testi, R. (1995)

Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal

*EMBO J*, 14, 5859-5868

Cohen, G.M. (1997)

Caspases: the executioners of apoptosis

*Biochem J*, 326, 1-16

Daugas, E., Cande, C., and Kroemer, G. (2001)

Erythrocytes: death of a mummy

*Cell Death Differ*, 8, 1131-1133

Dekkers, D.W., Comfurius, P., Bevers, E.M., and Zwaal, R.F. (2002)

Comparison between Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells

*Biochem J*, 362, 741-747

Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moeller, P., Krammer, P.H. (1992)

Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens

*J Immunol*, 149, 3166-3173

Douet, J.P., Castroviejo, M., Dodin, A., Bebear, C. (1992)

Purification and characterization of Kanagawa haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*

*Res Microbiol*, 143, 569-577

Drappa, J., Vaishnav, A.K., Sullivan, K.E., Chu, J.L., Elkon, K.B. (1996)  
The Canale-Smith syndrome: an inherited autoimmune disorder associated with defective lymphocyte apoptosis and mutations in the Fas gene  
*N Engl J Med*, 335, 1643-1649

Druml, W., Laggner, A.N., Lenz, K., Grimm, G., Schneeweiss, B. (1991)  
Pancreatitis in acute hemolysis  
*Ann Hematol*, 63, 39-41

Duan, H., Dixit, V.M. (1997)  
RAIDD is a new death adaptor molecule  
*Nature*, 385, 86-89

Durantón, C., Huber, S.M., and Lang, F. (2002)  
Oxidation induces a Cl<sup>-</sup>-dependent cation conductance in human red blood cells  
*J Physiol*, 539, 847-855

Eck, M.J., Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos, A.M., Sprang, S.R. (1992)  
The structure of lymphotoxin (tumor necrosis factor- $\beta$ ) at 1.9-Å resolution  
*J Biol Chem*, 267, 2119-2122

Eda, S., and Sherman, I.W. (2002)  
Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine  
*Cell Physiol Biochem*, 12, 373-384

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998)  
A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD  
*Nature*, 391, 43-50

Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A., Fiorentini, C. (1999)

*Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells

*Infect Immun*, 67, 1139-1148

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000)

A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells

*Nature*, 405, 85-90

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Henson, P.M. (2001a)

Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake and consequences

*J Clin Invest*, 108, 957-962

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., Bratton, D.L. (2001b)

Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts

*J Biol Chem*, 276, 1071-1077

Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., Puck, J.M. (1995)

Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome

*Cell*, 81, 935-946

Franco, R.S., Palascak, M., Thompson, H., Rucknagel, D.L., and 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, 4359-4365

Gleiss, B., Gogvadze, V., Orrenius, S., Fadeel, B. (2002)

Fas-triggered phosphatidylserine exposure is modulated by intracellular ATP

*FEBS Lett*, 519, 153-158

Gomez-Angelats, M., Bortner, C.D., and 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, 19609-19619

Goshima, K., Honda, T., Takeda, Y., and Miwatani, T. (1976)

Stopping of spontaneous beating of cultured mouse and rat myocardial cells by a toxin (thermostable direct hemolysin) from *Vibrio parahaemolyticus*

*Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 11, 615-620

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998)

Mitochondria and apoptosis

*Science*, 281, 1309-1312

Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A. (1995)

Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege

*Science*, 270, 1189-1192

Griffith, T.S., Yu, X., Herndon, J.M., Green, D.R., Ferguson, T.A. (1996)

CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance

*Immunity*, 5, 7-16

Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F., Kolesnick, R., Altman, A., Green, D.R. (1995)

FAS induced apoptosis is mediated via a ceramide initiated RAS signaling pathway

*Immunity*, 2, 341-351

Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassme, H. and Lang, F. (2000)

Physiology of apoptosis

*Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F605-F615

Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. (1994)

Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis

*J Exp Med*, 180, 525-535

Halperin, J.A., Brugnara, C., Tosteson, M.T., Van Ha, T., and Tosteson, D.C. (1989)

Voltage-activated cation transport in human erythrocytes

*Am J Physiol*, 257, C986-C996

Hannun, Y.A. (1996)

Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress

*Science*, 274, 1855-1859

Hannun, Y.A., and Luberto, S. (2000)

Ceramide in the eukaryotic stress response

*Trends Cell Biol*, 10, 73-80

Henson, P.M., Bratton, D.L., and Fadok, V.A. (2001)

The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?

*Nature Rev Mol Cell Biol*, 2, 627-633

Herold, G. *et al.* (2004)

Innere Medizin

*Gerd Herold, Köln*, S. 266-270

Hirsch, T., Marzo, I., Kroemer, G. (1997)

Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis

*Biosci Rep*, 17, 67-76

Hoashi, K., Ogata, K., Taniguchi, H., Yamashita, H., Tsuji, K., Mizuguchi, Y., and Ohtomo, N. (1990)

Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice

*Microbiol Immunol*, 34, 355-366

Hof, H., Dörries, R. (2000)

Medizinische Mikrobiologie

*Georg Thieme Verlag*, **2., korrigierte Auflage**, 388-393

Honda, T., Goshima, K., Takeda, Y., Sugino, Y., and Miwatani, T. (1976)

Demonstration of the cardiotoxicity of the thermostable direct hemolysin (lethal toxin) produced by *Vibrio parahaemolyticus*

*Infect Immun*, 13, 163-171

Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T., Adachi, T., and Kim, J. (1992)

The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin

*Can J Microbiol*, 38, 1175-1180

Huber, S.M., Gamper, N., and Lang, F. (2001)

Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts

*Pflugers Arch*, 441, 551-558

Hughes, F.M., Jr, and Cidlowski, J.A. (1999)

Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*

*Adv Enzyme Regul*, 39, 157-171

Hughes, F.M., Jr, Bortner, C.D., Purdy, G.D., and Cidlowski, J.A. (1997)

Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes

*J Biol Chem*, 272, 30567-30576

Huntley, J.S., and Hall, A.C. (1996)

Nature of the cation leak induced in erythrocyte membranes by Kanagawa haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*

*Biochem Biophys Acta*, 1281, 220-226

Huntley, J.S., Hall, A.C., Sathyamoorthy, V., and Hall, R.H. (1993)

Cation flux studies of the lesion induced in human erythrocyte membranes by the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*

*Infect Immun*, 61, 4326-4332

Huntley, J.S., Sathyamoorthy, V., Hall, R.H., and Hall, A.C. (1997)

Membrane attack induced by HlyA, a pore-forming toxin of *Vibrio cholerae*

*Hum Exp Toxicol*, 16, 101-105

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S.-I., Sameshima, M., Hase, A., Y., S., Nagata, S. (1991)

The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis

*Cell*, 66, 233-243

Jensen, B.S., Strobaek, D., Olesen, S.P., and Christophersen, P. (2001)

The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments?

*Curr Drug Targets*, 2, 401-422

Jeremias, I., Herr, I., Debatin, K.M. (1998)

TRAIL/APO-2 ligand-induced apoptosis in human T cells

*Eur J Immunol*, 28, 143-152

Johnson, R.M., Tang, K. (1992)

Induction of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes by mechanical stress

*Biochim Biophys Acta*, 1107, 314-318

Joiner, C.H. (1993)

Cation transport and volume regulation in sickle red blood cells

*Am J Physiol*, 264, C251-C270

Jones, E.Y., Stuart, D.I., Walker, N.P. (1992)

Crystal structure of TNF

*Immunol Ser*, 56, 93-127

Joseph, S.W., Colwell, R.R., Kaper, J.B. (1982)

*Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios

*Crit Rev Microbiol*, 10, 77-124

Kaestner, L., Bollensdorff, C., and Bernhardt, I. (1999)

Nonselective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane

*Biochim Biophys Acta*, 1417, 9-15

Kaiserova, K., Lakatos, B., Peterajova, E., Orlicky, J., Varecka, L. (2002)

Investigation of properties of the Ca<sup>2+</sup> influx and of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel efflux (Gardos effect) in vanadate-treated and ATP-depleted human red blood cells

*Gen Physiol Biophys*, 21, 429-442

Kamp, D., Sieberg, T., Haest, C.W. (2001)

Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes

*Biochemistry*, 40, 9438-9446

Katsikis, P.D., Garciaojeda, M.E., Torresroca, J.F., Tijoe, I.M., Smith, C.A., Herzenberg, L.A. (1997)

Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme like protease involvement in Fas induced and activation induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection: TNF related apoptosis inducing ligand can mediate activation induced T cell death in HIV infection

*J Exp Med*, 186, 1365-1372

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1995)

Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor

*EMBO J*, 14, 5579-5588

Kol, M.A., de Kruijff, B., de Kroon, A.I. (2002)

Phospholipid flip-flop in biogenic membranes: what is needed to connect opposite sides

*Semin Cell Dev Biol*, 13, 163-170

Krafte-Jacobs, B., Bock, G.H. (1996)

Circulating erythropoietin and interleukin-6 concentrations increase in critically ill children with severe sepsis and septic shock

*Crit Care Med*, 24, 1455-1459

Krasnik, L., Ochotny, R., Hryniewiecki, T., Paluszak, J., Cieslinski, A., Paradowski, S. (1999)

The level of erythropoietin in serum of patients with anemia during infective endocarditis

*Pol Arch Med Wewn*, 101, 113-115

Kumazawa, N.H., Kato, E. (1985)

Survival of Kanagawa-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* in a brackish-water area

*J Hyg (Lond)*, 95, 299-307

Lang, F., Lang, K.S., Wieder, T., Myssina, S., Birka, C., Lang, P.A., Kaiser, S., Kempe, D., Duranton, C., Huber, S.M. (2003a)

Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte

*Pflugers Arch*, 447, 121-125

Lang, F. (2000)

Basiswissen Physiologie

*Springer Verlag*, S. 153, 357

Lang, K.S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., Wieder T., Huber S.M. (2003b)

Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes

*Cell Death Differ*, 10, 249-256

Lang, K.S., Fillon, S., Schneider, D., Rammensee, H.G., and Lang, F. (2002a)

Stimulation of TNF $\alpha$  expression by hyperosmotic stress

*Pflugers Arch*, 443, 798-803

Lang, K.S., Roll, B., Myssina, S., Schittenhelm, M., Scheel-Walter, H.G., Kanz, L., et al. (2002b)

Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency

*Cell Physiol Biochem*, 12, 365-372

Lang, K.S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S.M., Lang, F., Duranton, C. (2003c)

Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride

*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367, 391-396

Lang, P.A., Kaiser, S., Myssina S., Wieder, T., Lang, F., Huber, S.M. (2003d)

Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis

*Am J Physiol Cell Physiol*, 285, C1553-C1560

Lang, P.A., Warskulat, U., Heller-Stilb, B., Huang, D.Y., Grenz, A., Myssina, S., Duszenko, M., Lang, F., Haussinger, D., Vallon, V., Wieder, T. (2003e)

Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice

*Cell Physiol Biochem*, 13, 337-346

Lang, K.S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P.A., Berchtold, S., Huber, S.M., Lang, F., Wieder, T. (2004a)

Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes

*Cell Death Differ*, 11, 231-243

## 6. Literaturverzeichnis

---

Lang, K.S., Myssina, S., Lang, P.A., Tanneur, V., Kempe, D.S., Mack, A.F., Huber, S.M., Wieder, T., Lang, F., Duranton, C. (2004b)

Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and  $\text{Cl}^-$

*Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F1046-1053

Lang, F., Lang, P.A., Lang, K.S., Brand, V., Tanneur, V., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S.M. (2004c)

Channel-induced apoptosis of infected host cells – the case of malaria

*Pflugers Arch*, 448, 319-324

Lew, V.L., and Bookchin, R.M. (1991)

Osmotic effects of protein polymerization: analysis of volume changes in sickle cell anemia red cells following deoxy-hemoglobin S polymerization

*J Membr Biol*, 122, 55-67

Li, H., Zhu, H., Xu, C.-J., Yuan, J. (1998)

Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis

*Cell*, 94, 491-501

Li, Q., Jungmann, V., Kiyatkin, A., Low, P.S. (1996)

Prostaglandin E2 stimulates a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability

*J Biol Chem*, 271, 18651-18656

Lim, S.K., Kim, H., Lim, S.K., bin Ali, A., Lim, Y.K., Wang, Y., Chong, S.M., Costantini, F., Baumman, H. (1998)

Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis

*Blood*, 92, 1870-1877

Lim, Y.K., Jenner, A., Ali, A.B., Wang, Y., Hsu, S.I., Chong, S.M., Baumman, H., Halliwell, B., Lim, S.K. (2000)

Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis

*Kidney Int*, 58, 1033-1044

Löffler, G., Petrides, P.E. (1998)

Biochemie und Pathobiochemie

*Springer Verlag*, **6., korrigierte Auflage**, S. 139, 176-178, 462

Longobardi-Givan, A. (1992)

Flow Cytometry – First Principles

*Wiley Liss, New York*

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter C., Wang, X. (1998)

Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors

*Cell*, 94, 481-490

Lynn, W.A., Cohen, J. (1995)

Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches

*Clin Infect Dis*, 20, 143-158

Maher, A.D., Kuchel, P.W. (2003)

The Gardos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes

*Int J Biochem Cell Biol*, 35, 1182-1197

Mammen, E.F. (1998)

The haematological manifestation of sepsis

*J Antimicrob Chemother*, 41, 17-24

Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Donahue, C.J., Pitti, R.M., Gray, C.L., Goddard, A.D., Bauer, K.D., Ashkenazi, A. (1996a)

Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- $\kappa$ B

*Curr Biol*, 6, 1669-1676

Marsters, S.A., Pitti, R.M., Donahue, C.J., Ruppert, S., Bauer, K.D., Ashkenazi, A. (1996b)

Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA

*Curr Biol*, 6, 750-752

McEvoy, L., Williamson, P., and Schlegel, R.A. (1986)

Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages

*Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 3311-3315

McGilvray, I.D., Rotstein, O.D. (1998)

Role of the coagulation system in the local and systemic inflammatory response.

*World J Surg*, 22, 179-186

Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1997)

FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)

*EMBO J*, 16, 2794-2804

Messmer, U.K., and Pfeilschifter, J. (2000)

New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells

*Bioessays*, 22, 878-881

Mesters, R.M., Mannucci, P.M., Coppola, R., Keller, T., Ostermann, H., Kienast, J. (1996)

Factor VIIa and antithrombin III activity during severe sepsis and septic shock in neutropenic patients

*Blood*, 88, 881-886

Montague, J.W., Bortner, C.D., Hughes, F.M., Jr, and Cidlowski, J.A. (1999)

A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis

*Steroids*, 64, 563-569

Morris, J.G., Jr. (2003)

Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oyster on the half shell

*Clin Infect Dis*, 37, 272-280

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, 817-827

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, 2750-2757

Myssina, S., Lang, P.A., Kempe, D.S., Kaiser, S., Huber, S.M., Wieder, T., Lang, F. (2004)

Cl<sup>-</sup>-channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca<sup>2+</sup>-induced erythrocyte apoptosis

*Cell Physiol Biochem*, 14, 241-248

Naim, R., Iida, T., Takahashi, A., and Honda, T. (2001a)

Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells

*FEMS Microbiol Lett*, 196, 99-105

Naim, R., Yanagihara, I., Iida, T., and Honda, T. (2001b)

*Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside of the cells

*FEMS Microbiol Lett*, 195, 237-244

Nebe, C.T. (1996)

Durchflusszytometrische Messtechnik und Datenauswertung

*Infusionsther Transfusionsmed*, 23, 111-113

Nicholson, D.N., Thornberry, N.A. (1997)

Caspases: killer proteases

*Trends Biochem Sci*, 22, 299-306

Nishibuchi, M., Fasano, A., Russell, R.G., and Kaper, J.B. (1992)

Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin

*Infect Immun*, 60, 3539-3545

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C., Pansting, I.K., Krammer, P.H. (1992)

Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen

*J Biol Chem*, 267, 10709-10715

Okuda, J., and Nishibuchi, M. (1998)

Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene

*Mol Microbiol*, 30, 499-511

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1997)

The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL

*Science*, 276, 111-113

Perez, G.I., Maravei, D.V., Trbovich, A.M., Cidlowski, J.A., Tilly, J.L., and 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, 1358-1369

Petit, P.X., Zamzami, N., Vayssiere, J.L., Mignotte, B., Kroemer, G., Castedo, M. (1997)

Implication of mitochondria in apoptosis

*Moll Cell Biochem*, 174, 185-8

Poghosyan, G.G., Melkonyan, V.Z., Mikaelyan, M.V., Gasparyan, V.K. (2003)

A simplified method for purification of annexin V from human placenta

*Prep Biochem Biotechnol*, 33, 209-215

Raffael, A., Nebe, C.T., Valet, G. (1994)

Grundlagen der Durchflußzytometrie in: Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik

Schmitz, G., Rothe, G. (Hrsg.)

*Schattauer-Verlag, Stuttgart*

Raimondi, F., Kao, J.P., Kaper, J.B., Guandalini, S., and Fasano, A. (1995)

Calcium-dependent intestinal chloride secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model

*Gastroenterology*, 109, 381-386

Raimondi, F., Kao, J.P., Fiorentini, C., Fabbri, A., Donelli, G., Gasparini, N., Rubino, A., Fasano, A. (2000)

Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems

*Infect Immun*, 68, 3180-3185

Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatin, K.M., Fischer, A., de Villartay, J.P. (1995)

Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity  
*Science*, 268, 1347-1349

Rosette, C., and Karin, M. (1996)

Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors  
*Science*, 274, 1194-1197

Rothhut, B., Comera, C., Cortial, S., Haumont, P.Y., Diep Le, K.H., Cavadore, J.C., Conard, J., Russo-Marie, F., Lederer, F. (1989)

A 32 kDa lipocortin from human mononuclear cells appears to be identical with the placental inhibitor of blood coagulation  
*Biochem J*, 263, 929-935

Sakurai, J., Honda, T., Jinguji, Y., Arita, M., and Miwatani, T. (1976)

Cytotoxic effect of the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* on FL cells  
*Infect Immun*, 13, 876-883

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.-M., Krammer, P., Peter, M.E. (1998)

Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways  
*EMBO J*, 17, 1675-1687

Schlaepfer, D.D., Mehlman, T., Burgess, W.H., Haigler, H.T. (1987)

Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 6078-6082

Schmidt, R.F., Thews, G., Lang, F. (2000)

Physiologie des Menschen

*Springer Verlag*, **28., korrigierte Auflage**, S. 7-8, 604-608

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. (1998)

Apoptosis signaling by death receptors

*Eur J Biochem*, 254, 439-459

Shapiro, H.M. (2003)

Practical Flow Cytometry

*Wiley-Liss*, Hoboken New Jersey, **4. Auflage**

Sessler, C.N., Shephard, W. (2002)

New concepts in sepsis

*Curr Opin Crit Care*, 8, 465-472

Seyama, L., Irisawa, H., Honda, T., Takeda, T., and Miwatani, T. (1976)

Increase in membrane conductance and positive inotropic action of hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* on rabbit myocardium

*Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 11, 621-625

Seyama, I., Irisawa, H., Honda, T., Takeda, Y., and Miwatani, T. (1977)

Effect of hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* on membrane conductance and mechanical tension of rabbit myocardium

*Jpn J Physiol*, 27, 43-56

Soboleva, M.K., Sharapov, V.I., Deriagina, L.P., Chernov, Iu.L., Sasin, A.V. (1993)

The metabolic activity of the erythrocytes and the characteristics of ferrokinetics in children with sepsis

*Gematol Transfuziol*, 38, 15-18

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1996)

Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases

*Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 14486-14491

Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., Seed, B. (1995)

RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death

*Cell*, 81, 513-523

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Daugas, E., Wang, H.G., Geley, S., Fassy, F., Reed, J.C., Kroemer, G. (1997)

The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis

*J Exp Med*, 1997, 25-37

Tait, J.F., Frankenberry, D.A., Shiang, R., Murray, J.C., Adler D.A., Disteche, C.M. (1991)

Chromosomal localization of the human gene for annexin V (placental anticoagulant protein I) to 4q26----q28

*Cytogenet Cell Genet*, 57, 187-192

Takahashi, A., Kenjyo, N., Imura, K., Myonsun, Y., and Honda, T. (2000a)

Cl<sup>-</sup> secretion in colonic epithelial cells induced by the *Vibrio parahaemolyticus* hemolytic toxin related to thermostable direct haemolysin

*Infect Immun*, 68, 5435-5438

Takahashi, A., Sato, Y., Shiomi, Y., Cantarelli, V.V., Iida, T., Lee, M., and Honda, T. (2000b)

Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line

*J Med Microbiol*, 49, 801-810

- Takahashi, A., Iida, T., Naim, R., Naykaya, Y., and Honda, T. (2001)  
Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* depends on colonic cell maturation  
*J Med Microbiol*, 50, 870-878
- Tang, G.Q., Iida, T., Yamamoto, K., and Honda, T. (1995)  
Ca<sup>2+</sup>-independent cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH) on Intestine 407, a cell line derived from human embryonic intestine  
*FEMS Microbiol Lett*, 134, 233-238
- Tang, G., Iida, T., Yamamoto, K., and Honda, T. (1997)  
Analysis of functional domains of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin using monoclonal antibodies  
*FEMS Microbiol Lett*, 150, 289-296
- Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., Kroenke, M. (1994)  
Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling  
*Cell*, 78, 1005-1015
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. (1995)  
Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis  
*Immunity*, 3, 673-682
- Williamson, P., Algarin, L., Bateman, J., Choe, H.R., and Schlegel, R.A. (1985)  
Phospholipid asymmetry in human erythrocyte ghosts  
*J Cell Physiol*, 123, 209-214
- Wolfs, J.L., Comfurius, P., Bevers, E.M., Zwaal, R.F. (2003)  
Influence of erythrocyte shape on the rate of Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of phosphatidylserine  
*Mol Membr Biol*, 20, 83-91

Woon, L.A., Holland, J.W., Kable, E.P., and Roufogalis, B.D. (1999)  
Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts  
*Cell Calcium*, 25, 313-320

Yang, X., Khoravi Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D. (1997)  
Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis  
*Cell*, 89, 1067-1076

Yoh, M., Honda, T., Miwatani, T., and Nishibuchi, M. (1991)  
Characterization of thermostable direct hemolysin encoded by four representative tdh genes of  
*Vibrio parahaemolyticus*  
*Microb Pathog*, 10, 165-172

Yoh, M., Miwatani, T., and Honda, T. (1992)  
Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin (Vp-TRH) produced by environmental  
and clinical isolates  
*FEMS Microbiol Lett*, 71, 157-161

Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X., Kroemer, G. (1997)  
Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis  
*J Bioenerg Biomembr*, 29, 185-193

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997)  
Apaf-1, a human protein, homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-  
dependent activation of caspase-3  
*Cell*, 90, 405-413

## 7 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Florian Lang für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Laborleiter Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. Thomas Wieder.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Philipp A. Lang für seine stets geduldige Betreuung und seine Unterstützung nicht nur im Rahmen dieser Doktorarbeit bedanken.

Ferner wurde die Durchführung dieser Arbeit durch die Mithilfe mehrerer hilfsbereiter Menschen, denen ich ebenfalls herzlich danken möchte, ermöglicht. Dies sind im Einzelnen:

Herr Priv. Doz. Dr. rer. nat. Stephan M. Huber für die Durchführung der patch clamp Versuche.

Herr Prof. Dr. med. Hinnak Northoff und Herr Dr. med. Christof Weinstock für die Mithilfe bei der Bestimmung verschiedener Blutparameter.

Frau Daniela Kempe, Frau Swetlana Myssina, Frau Christina Birka und alle anderen Kollegen am Physiologischen Institut, die stets zur angenehmen und freundlichen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Für die Korrektur der Endfassung möchte ich mich bei Herrn Christoph C. F. Schanze von ganzem Herzen bedanken.

Bei allen meinen Freunden, besonders bei Frau Mirjam Renovanz, Frau Solène Kalle, Herrn Gottlieb Maier, Herrn Tobias Hermle und Herrn Philipp A. Lang, bedanke ich mich für die anregende, lehrreiche und vor allem wunderschöne gemeinsam verbrachte Studienzeit.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester und der ganzen Familie, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein kann.

## 8 Lebenslauf

### Stefanie Kaiser

Geburtsdatum	01.05.1981
Geburtsort	Biberach a.d. Riß
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Mutter	Margot Kaiser, geb. Sonntag, geb. am 26.01.1959 Meisterin für Hauswirtschaft und Ernährung
Vater	Peter Kaiser, geb. am 20.02.1958 Chemielaborant
1987-1991	Grundschule Hechingen
1991-2000	Gymnasium Hechingen
Juni 2000	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Oktober 2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
September 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2005-Oktober 2006	Praktisches Jahr in den Zollernalbkliniken Albstadt/Hechingen und in Winterthur
09. November 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14. November 2006	Approbation als Ärztin