

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung Physiologie I

Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

# Programmierter Zelltod fetaler Erythrozyten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen



vorgelegt von  
Tobias Franz Hermle  
aus  
Oberndorf a. N.  
2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichtstatter Professor Dr. I. Bernhardt



## **Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Apoptose Grundlagen	6
1.1.1	Apoptose - historische Einordnung	6
1.1.2	Apoptose und Nekrose	7
1.1.3	Bedeutung der Apoptose	8
1.1.4	Signalwege der Apoptose	9
1.2	Erythrozyten und ihr Sterben	11
1.2.1	Grundlagen der Erythrozytenphysiologie	11
1.2.2	Erythrozyt und Transport der Atemgase	12
1.2.3	Alterung der Erythrozyten (Senescence)	14
1.2.4	Die Entdeckung der Eryptose	15
1.2.5	Signalwege der Eryptose	16
1.2.6	Vorkommen und Bedeutung der Eryptose	19
1.3	Physiologie des Ungeborenen	20
1.3.1	Der fetale Kreislauf	20
1.3.2	Fetale Erythrozyten und fetales Blut	21
1.3.3	Umstellung nach der Geburt	23
1.4	Zielsetzung	24
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Erythrozyten	26
2.2	Verwendete Lösungen	26
2.1.1	Ringerlösung	27
2.1.2	Chloridfreie Lösung	27
2.1.3	Hyperosmolare Lösung	28
2.1.4	Glucosefreie Lösung	28
2.3	Verwendete Substanzen	29
2.4	Methoden	30
2.4.1	Die Durchflusszytometrie	30
2.4.2	Annexin-Messung	31
2.4.3	Intrazelluläre Calcium-Messung	31
2.4.4	Ceramid-Messung	32
2.4.5	PGE <sub>2</sub> -Bestimmung	33
2.4.6	Patch-clamp	34
2.4.7	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.5	Statistik	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Spontane Phosphatidylexposition	39
3.2	Annexin-Bindung nach verschiedenen Stressoren	40
3.2.1	Annexin-Bindung nach Glucose-Depletion	40
3.2.2	Annexin-Bindung durch oxidativen Stress	42
3.2.3	Annexin-Bindung durch Chloridwegnahme	43
3.2.4	Annexin-Bindung durch hyperosmolaren Schock	45
3.3	Forward scatter nach verschiedenen Stressoren	46
3.3.1	FSC nach Glucose-Depletion	46

3.3.2	FSC nach hyperosmolarem Schock.....	47
3.3.3	FSC nach Chloridwegnahme .....	48
3.3	Fluoreszenzmikroskopie bei Chloridwegnahme .....	50
3.4	Patch-clamp bei Chloridwegnahme.....	51
3.5	Intrazelluläre Calcium-Messung .....	52
3.6	PGE <sub>2</sub> -Wirkung.....	54
3.6.1	PGE <sub>2</sub> - Freisetzung durch Chloridwegnahme .....	54
3.6.2	Annexin-Bindung durch PGE <sub>2</sub> .....	55
3.7	Spontane Ceramid-Freisetzung .....	56
3.8	Annexin-Bindung durch PAF .....	56
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1	Methodendiskussion .....	59
4.2	Ergebnisdiskussion .....	60
4.2.1	Spontane Annexinbindung.....	60
4.2.2	Annexin-Bindung gestresster Zellen .....	61
4.2.3	Betrachtung der Zellgröße über den forward scatter.....	63
4.2.4	PGE <sub>2</sub> und Calcium-Signalweg bei Chloridwegnahme .....	64
4.2.5	PAF und Ceramid-Signalweg.....	66
4.3	Schlussfolgerung .....	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>
7.1	Abkürzungen .....	87
7.2	Publikationsverzeichnis.....	89
7.3	Danksagung .....	90
7.4	Lebenslauf .....	91

# 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose Grundlagen

### 1.1.1 Apoptose - historische Einordnung

Das Grundkonzept der Apoptose (griechisch απόπτωσης – in etwa „das Abfallen der Blätter im Herbst“), welches den physiologischen Untergang von Gewebe im Sinne eines gewünschten Selbstmordprogrammes beinhaltet, wurde erstmals von Rudolf Virchow [Virchow, 1858] beschrieben. Dieses von ihm damals Nekrobiose genannte Prinzip, stellte er der Nekrose als dem von außen herbeigeführten Zelltod gegenüber [Conti et al., 2005]. Schon früher hatte Carl Vogt den „programmierten“ Tod von Zellen im Rahmen der Ontogenese beobachtet [Vogt, 1842]. Allerdings wurde dieser Erscheinung damals selbst von ihren Entdeckern keine große Bedeutung beigemessen [Clarke und Clarke, 1996] und die Apoptoseforschung führte lange Zeit ein Schattendasein [Curtin und Cotter, 2003].

In den 50er und 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde der lichtmikroskopisch erkennbare Ablauf beschrieben sowie die Bedeutung der Apoptose in der Entwicklung entdeckt [Glucksmann, 1951; Lockshin und Williams, 1965; Saunders, Jr., 1966]. Kerr, Wyllie und Currie fügten schließlich einige der Puzzlestücke zusammen und etablierten den Begriff „Apoptose“ [Kerr et al., 1972]. Sie erkannten, dass Apoptose ein grundlegendes Prinzip der Homöostase darstellt [Kerr, 2002].

Erkenntnisse zur genetischen Grundlage brachte die Erforschung des Wurmes *Caenorhabditis elegans* [Sulston, 1976; Ellis und Horvitz, 1986]. Während seiner Entwicklung gehen stets 131 von 1090 somatischen Zellen derselben Linie zugrunde. Über Mutanten, die keine Apoptose zeigen, konnte bewiesen werden, dass bestimmte Gene die Apoptose steuern, es sich somit tatsächlich um einen programmierten Zelltod handelt [Ellis und Horvitz, 1986]. Durch die Beobachtung, dass die Einschleusung eines *humanen* BCL-2-Gens die Apoptose in *C. elegans* hemmt, wurde gezeigt, dass die Ergebnisse auch auf Vertebraten anwendbar sind.

Einen komfortablen Apoptosemarker erkannte man schließlich in der Tatsache, dass apoptotische Zellen Phosphatidylserin auf der Oberfläche zeigen [Fadok et al., 1992]. In den 1990er Jahren erlebte die Apoptoseforschung eine gewaltige Expansion [Melino et al., 2001], so dass sie mittlerweile mehr als 2% aller Publikationen im Bereich der Biowissenschaften ausmacht [Curtin und Cotter, 2003]. Die erythrozytäre Sonderform des programmierten Zelltods ist eine relativ neue Entdeckung. Gleichwohl stellt sie ein rasch expandierendes Forschungsfeld dar.

### **1.1.2 Apoptose und Nekrose**

Grundsätzlich kann eine Zelle auf zweierlei Arten sterben: durch Apoptose oder durch Nekrose. Letztere wird ausgelöst durch unphysiologische Lebensbedingungen wie den Mangel an Nährstoffen oder Sauerstoff, durch starke Noxen wie Gifte oder Strahlung sowie durch massive Änderungen des extrazellulären Milieus bezüglich Osmolarität, pH-Wert oder Temperatur. Die so geschädigte Zelle sieht sich außer Stande, ihr inneres Milieu länger zu kontrollieren. Die inneren Kompartimente kollabieren und die teils aggressiven Inhalte der Organellen wie etwa der Lysosomen ergießen sich ins Zytosol. Die Zelle beginnt durch den Ausfall der Ionenpumpen anzuschwellen (Onkose), schließlich reißt die Zellmembran (Lyse) und die intrazellulären Bestandteile werden freigesetzt. Dies führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit konsekutiver Gewebeschädigung [Kroemer et al., 1998].

Bei der Apoptose hingegen stirbt die Zelle, ohne ihrer Umgebung zu schaden. Zu den Auslösern gehören der Entzug von Wachstumsfaktoren [Armato et al., 1986] sowie eine Unzahl endogener und exogener Stimuli. Dabei folgt die Zelle einem fein orchestrierten Protokoll. Zuerst beginnt sie zu schrumpfen, wobei der Stoffwechsel jedoch vorerst weiterläuft und die Kompartimentierung nicht aufgehoben wird. Das Chromatin im Zellkern kondensiert, der Kern zerbricht in mehrere Teile (Karyorhexis) und die Zelle beginnt Ausstülpungen ihrer Plasmamembran zu zeigen (Zeiosis), bis sich schließlich kleine „apoptotische Körperchen“ von der Zelle ablösen [Kerr et al., 1972]. Dabei handelt es sich um

membranzusammenschlossene Vesikel, welche dicht gepackt Zellorganellen und Kernfragmente enthalten [Green und Reed, 1998; Saraste und Pulkki, 2000]. Zugleich zeigt sich Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Dabei handelt es sich um ein Lipid, welches normalerweise nur im inneren Teil der Zellmembran auftritt. Auf der Oberfläche wirkt es als ein Phagozytose-Signal [Fadok et al., 1992]. Abschließend werden die Vesikel von benachbarten Zellen oder phagozytierenden Immunzellen aufgenommen und dort lysosomal verdaut [Liu et al., 2006].

Trotz des großen konzeptuellen Unterschiedes scheinen die beiden Arten des Zelltodes je nach Art und Stärke des Stimulus auch Übergangsformen zu zeigen [Papucci et al., 2004].



### 1.1.3 Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose ist eine grundlegende Fähigkeit in mehrzelligen Organismen, die in der Evolution offensichtlich hoch konservativ ist. Komplexere Organismen ergänzen den Kernmechanismus dann durch weitere Merkmale [Twomey und McCarthy, 2005]. Man kann davon ausgehen, dass nahezu alle mehrzelligen Organismen zu programmiertem Zelltod in der Lage sind [Huettenbrenner et al., 2003]. Dadurch wird es einem mehrzelligen Organismus ermöglicht,

überflüssige oder gar schädliche Zellen auf eine für den Gesamtorganismus ungefährliche Weise zu entfernen. Ungefähr 100.000 Zellen werden jede Sekunde im menschlichen Körper durch Mitose produziert und ungefähr dieselbe Anzahl stirbt durch Apoptose [Jacobson et al., 1997]. Dabei nimmt Apoptose zahlreiche grundlegende Funktionen im Organismus wahr. Schon die Embryo- und Fetogenese sind auf die schonende Rückbildung bestimmter Gewebe angewiesen. Auch später erfordert die ständige Regeneration fast aller Gewebe, dass alte Zellen schadlos und effizient entfernt werden. In diesem Rahmen gewährleistet die Apoptose durch frühzeitige Entfernung gefährdeter Zellen auch die stetige Vermeidung der Tumorbildung [Lee und Bernstein, 1995]. Die Abwehr vieler Virusinfektionen gelingt durch die rechtzeitige Apoptose befallener Zellen. Generell spielt der programmierte Zelltod im Immunsystem eine entscheidende Rolle, zum einen bei der Rückbildung der Immunantwort und zum anderen bei der Selektionierung für den eigenen Körper unschädlicher, d.h. nicht autoreaktiver Zellen.

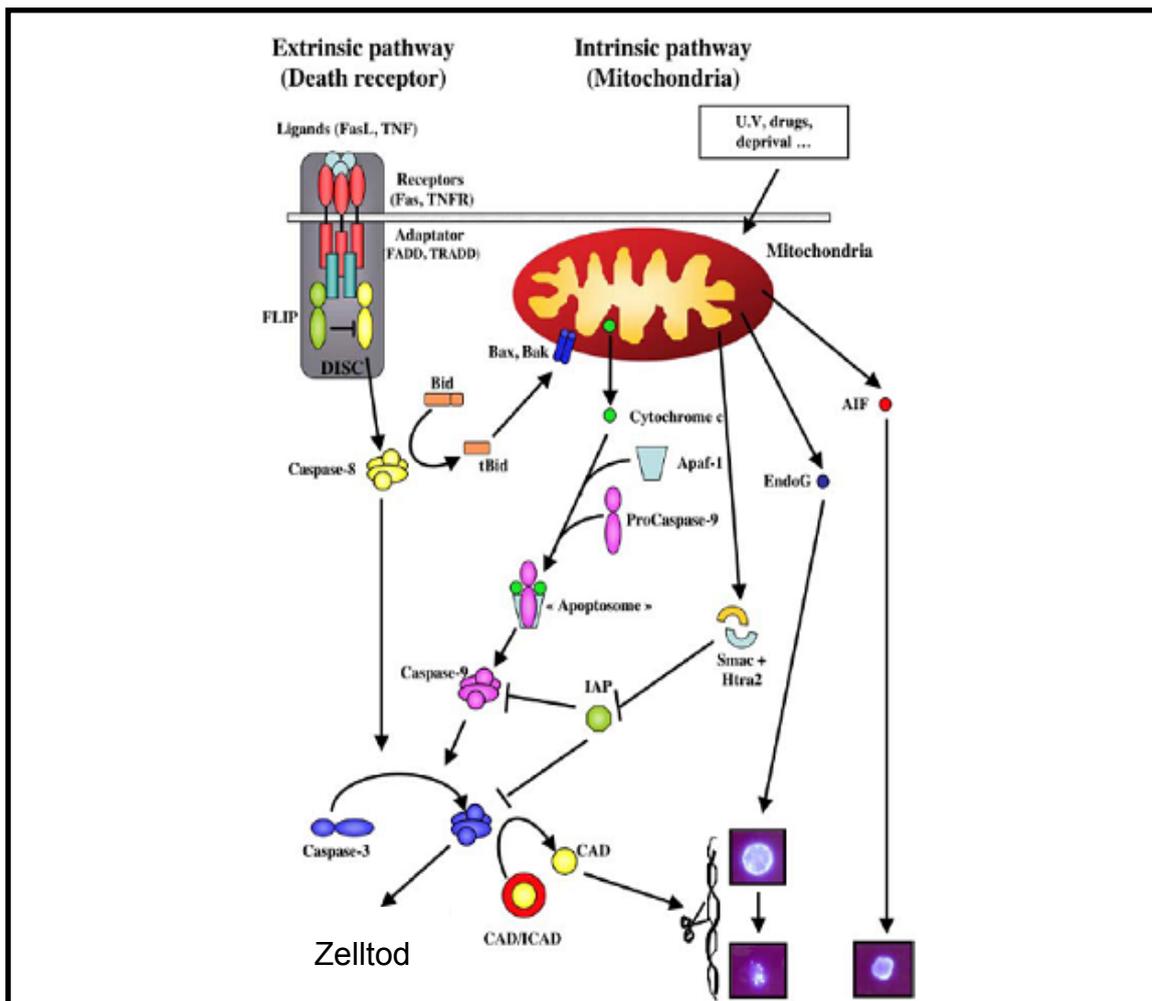
Darüber hinaus ist eine Fehlsteuerung der Apoptose für zahllose Krankheiten verantwortlich. Neben den bereits erwähnten Neoplasien und Virusinfektionen wie AIDS [Thompson, 1995] sind hier insbesondere neurodegenerative und Autoimmunerkrankungen zu nennen [Messmer und Pfeilschifter, 2000; Fadeel und Orrenius, 2005]. Aber auch bei anderen Krankheiten wie etwa dem Herzinfarkt ist Apoptose von Bedeutung [Eefting et al., 2004]. Manche Schätzungen gehen sogar davon aus, dass gestörte Apoptoseregulation für ungefähr die Hälfte jener Erkrankungen zumindest mitverantwortlich ist, für die bislang keine oder unzureichende Therapie zur Verfügung steht [Reed, 2002].

### **1.1.4 Signalwege der Apoptose**

Die entscheidenden Effektormoleküle der Apoptose bei kernhaltigen Zellen sind die Caspasen. Dabei handelt es sich um eine Familie von Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum, welche nach Aspartat spalten [Black et al., 1989; Cerretti et al., 1992]. Daher leitet sich auch der Name ab (C-asp-ase). Sie werden als inaktive Vorstufen synthetisiert und durch Spaltung aktiviert. Dabei

läuft eine Signal-Kaskade ab, wobei die teils autoaktivierten Initiator-Caspasen die Effektor-Caspasen aktivieren. Letztere sorgen durch ihre proteolytische Funktion entscheidend für die Umsetzung der Apoptose [Yuan und Horvitz, 1992; Samali et al., 1999]. Dies geschieht unter anderem durch die Zerlegung der DNA und die Auflösung des Zellkerns [Gerner et al., 2002]. Es gibt allerdings auch Formen des programmierten Zelltods, die ohne Caspasen auskommen [Leist und Jaattela, 2001]. Darüber hinaus nehmen Caspasen noch weitere Funktionen im Organismus wahr wie etwa bei Entzündung oder Differenzierung [Nhan et al., 2006].

Die Aktivierung der Caspasen geschieht im Wesentlichen über zwei Signalwege. Der so genannte intrinsische Signalweg funktioniert durch die Freisetzung von Cytochrom C und anderer Mediatoren wie AIF aus den Mitochondrien [Orrenius, 2004]. Diese wiederum aktivieren dann die Caspasen oder stimulieren direkt die Apoptose. Dies kann beispielsweise durch DNA-Schädigung ausgelöst werden [Lassus et al., 2002]. Der extrinsische Signalweg wird über membranständige Rezeptoren (death receptor family) aktiviert. Nach Bindung eines Liganden wie etwa  $\text{TNF } \alpha$  an den Rezeptor werden die Effektor-Caspasen durch die Bildung eines Komplexes (sog. death-inducing complex = DISC) mit intrazellulären Cofaktoren aktiviert [Krammer, 2000]. Diese beiden Signalwege sind untereinander vernetzt und werden kontrolliert durch zahlreiche Steuerungsmoleküle wie beispielsweise die Inhibitorenklassen BCL-2, IAP und Aktivatoren wie Bax oder Smac. Bid stellt eine Verbindung beider Signalwege dar.



**Abbildung 2: Signalwege der Apoptose.**

Das Bild zeigt nur einen Ausschnitt der komplexen Vorgänge. Man sieht die Interaktion der beiden Hauptsignalwege, aber auch unabhängige, direkt auf den Zellkern wirkende Mediatoren wie EndoG und AIF, was sonst durch die DNase CAD vermittelt wird.

Aus: Petit, Intrinsic and extrinsic pathways signalling during HIV-1 mediated cell death, 2003

## 1.2 Erythrozyten und ihr Sterben

### 1.2.1 Grundlagen der Erythrozytenphysiologie

Erythrozyten sind außergewöhnliche Zellen. Im Rahmen ihrer Entstehung über mehrere Vorläuferzellen wird mehr und mehr Hämoglobin gebildet, bis nahezu die gesamte Zelle damit angefüllt ist. Der Vorgang dauert etwa 2-5 Tage und wird insbesondere durch das Hormon Erythropoietin kontrolliert. Am Ende des Prozesses verlieren die Erythrozyten ihre Zellorganellen sowie die RNA. Damit

sind reife rote Blutkörperchen weder zur Proteinsynthese noch zur oxidativen Energiegewinnung in der Lage (die auch im peripheren Blut anzutreffenden Retikulozyten allerdings enthalten noch RNA und können wohl zumindest noch Hämoglobin synthetisieren). Dennoch sind Erythrozyten nicht einfach nur mit rotem Blutfarbstoff gefüllte Hüllen, sondern zeigen eine komplexe Physiologie. Ihre nahezu ausschließliche Energiequelle stellt die Glycolyse dar. Der ebenfalls vorhandene Pentosephosphatzyklus stellt Redoxäquivalente in Form von NADPH zur Verfügung. Über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) und Glutathion kann sich der Erythrozyt so gegen oxidativen Stress schützen. [Bossi und Giardina, 1996]. Bei einer Zelle voller Sauerstoff (Radikalenbildung) ohne die Fähigkeit zur Neubildung eventuell beschädigter Proteine hat dies natürlich besondere Bedeutung.

Der ca. 7  $\mu\text{m}$  großen Erythrozyt muss durch die kleinsten Kapillaren gelangen können, wobei diese teilweise einen viel kleineren Durchmesser aufweisen als der Erythrozyt selbst (bis zu 2  $\mu\text{m}$ ). Das rote Blutkörperchen muss also über eine besonders elastische und zugleich robuste Struktur verfügen. Zu diesem Zweck wird die Lipid-Doppelschicht der Membran durch das Protein Ankyrin mit dem Spektrin-Gerüst des Cytoskeletts vernetzt. Ansatzstelle des Ankyrin sind durch die Membran reichenden Proteine wie das Protein 4.1 oder der Anionentauscher (auch AE1 oder Bande 3). Letzterer ist eines der häufigsten und wichtigsten Membranproteine des Erythrozyten. Er dient auch dem  $\text{CO}_2$ -Transport und spielt eine Rolle bei der Alterung (s.u.). Daneben besitzt der Erythrozyt natürlich noch zahlreiche weitere Membrantransporter, die beispielsweise dem Erhalt des Membranpotentials ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe) oder der Volumensteuerung (Gardos- $\text{K}^+$ -Kanal, Aquaporine) dienen. Auch  $\text{Ca}^{2+}$  wird energieabhängig aus der Zelle geschafft ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase).

### **1.2.2 Erythrozyt und Transport der Atemgase**

Die Hauptaufgabe des Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff und  $\text{CO}_2$ . Dies ist notwendig, weil nur geringe Mengen Sauerstoff physikalisch im Plasma gelöst werden können. Der überwiegende Teil des  $\text{O}_2$  muss also auf andere

Weise transportiert werden. Dazu dient eine chemische Bindung an das Hämoglobin. Dieses besitzt vier Häm-Moleküle mit reduziertem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Im Zusammenspiel mit vier Globinproteinen ist es in der Lage, je nach Sauerstoffpartialdruck bis zu vier Moleküle Sauerstoff aufzunehmen und, was genauso wichtig ist, bei niedrigerem Sauerstoffpartialdruck im peripheren Gewebe wieder abzugeben. Beim erwachsenen Menschen vorherrschend ist dabei das Hämoglobin A<sub>1</sub> (HbA<sub>1</sub>) mit zwei  $\alpha$ -Ketten und zwei  $\beta$ -Ketten, welches 96-98 % des Hämoglobins ausmacht. Daneben tritt zu 1-3 % das HbA<sub>2</sub> auf, welches sich aus zwei  $\alpha$  und zwei  $\delta$ -Ketten zusammensetzt. Das Eisen der prosthetischen Häm-Gruppe läuft stets Gefahr oxidiert zu werden und das so entstehende Methämoglobin kann keinen Sauerstoff mehr transportieren. Der Erythrozyt muss deshalb durch die Methämoglobin-Reduktase den Met-Hb-Spiegel niedrig halten.

Die Sauerstoffbindungskurve (Anteil oxigeniertes Hb pro Sauerstoffpartialdruck) des Hämoglobins wird von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert und CO<sub>2</sub>-Partialdruck (Bohr-Effekt), Temperatur oder dem Glycolyse-Metaboliten 2,3-Diphosphoglycerat beeinflusst [Antonini et al., 1977]. Letztlich wirken diese Faktoren so zusammen, dass eine hohe Affinität zu Sauerstoff unter den Bedingungen der Lunge und eine niedrigere Affinität zu Sauerstoff unter den Bedingungen des peripheren Gewebes entsteht [Perutz, 1969].

Die Umkehrung gilt für die Affinität zu Kohlendioxid. Die im Erythrozyten vorhandene Carboanhydrase sorgt für eine schnelle Lösung des Kohlendioxids als H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, weshalb CO<sub>2</sub> in erheblich größerem Maße als O<sub>2</sub> im Plasma gelöst und auf diesem Wege transportiert werden kann. H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dissoziiert rasch und da die Erythrozytenmembran für Protonen wenig durchlässig ist, verbleibt H<sup>+</sup> in der Zelle und wird unter diesen Bedingungen verstärkt an das Hämoglobin gebunden und so gepuffert. Das gebildete HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hingegen verlässt größtenteils im Austausch gegen Chlorid die Zelle über den so genannten Anionentauscher (sog. Hamburger-Shift). Nur ein kleiner Teil (10-20 %) wird N-terminal als Carbaminogruppe an das Hämoglobin gebunden. Bei höherem Sauerstoffdruck kehren sich die Vorgänge um und auch das gebundene CO<sub>2</sub> wird wieder gelöst

(Haldane-Effekt). Der Erythrozyt erfüllt so neben dem Transport der Atemgase auch die Funktion der pH-Regulation.

### **1.2.3 Alterung der Erythrozyten (Senescence)**

Die Lebensspanne eines Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage. Das bedeutet, dass pro Tag knapp ein Prozent der Erythrozyten aussortiert werden muss. Ein simples Platzen (Hämolyse), was eine Freisetzung des Zellinhalts in die Blutbahn zur Folge hätte, ist für den Organismus schädlich. Insbesondere freies Hämoglobin ist dabei für den Körper ungünstig, da es die Nieren schädigt (bis hin zum akuten Nierenversagen) und das Eisen „recycled“ werden soll. Frei zirkulierendes Hämoglobin wird daher an Haptoglobin gebunden und dann von Makrophagen aufgenommen [Wassell, 2000; Kristiansen et al., 2001]. Umso mehr muss nach dem gleichen Prinzip auch der ganze Erythrozyt am Ende seines Lebens durch Makrophagen in Milz und Leber (Kupffer-Zellen) abgebaut werden [Willekens et al., 2005]. Da die Lebensspanne relativ konstant und artspezifisch ist, handelt es sich dabei wohl um einen gesteuerten Prozess. Wie dies im Detail vor sich geht, ist teilweise noch unklar. Eine entscheidende Rolle spielt jedoch die Bindung von Autoantikörpern an ein Antigen, welches aus einem veränderten Membranprotein (Anionentauscher/Bande 3) hervorgeht [Bosman et al., 2005]. Dadurch werden die Erythrozyten opsoniert und somit rasch durch Makrophagen aus dem Kreislauf entfernt. Im Übrigen schrumpfen die Erythrozyten durch Abgabe kleiner Vesikel, die durch Phosphatidylserin-Exposition von den Makrophagen aufgenommen werden [Willekens et al., 2003]. Die Bildung dieser Vesikel wird wohl in der Milz angeregt. Dadurch verlieren die Erythrozyten bis zu 20 % ihrer Masse. Welche Rolle Phosphatidylserin für die Alterung und Phagozytose der Erythrozyten spielt ist bislang strittig [Kuypers und de, 2004; Lutz, 2004]. Auch die Frage, ob und inwieweit es sich bei diesem Alterungsprozess um eine Form der Apoptose handelt, ist bislang unbeantwortet.

#### 1.2.4 Die Entdeckung der Eryptose

Erythrozyten streben jedoch nicht einfach dem Endpunkt einer definierten Lebensspanne entgegen. Ihr Dasein bietet im Minutentakt viele Belastungen wie oxidativen Stress in der Lunge, osmotischen Schock in der Niere, den turbulenten Blutstrom großer Gefäße und die drangvolle Enge der Kapillaren. Da Hämolyse wie gezeigt schädlich ist, sollte man also eigentlich einen stressinduzierten Apoptosemechanismus erwarten. Andererseits fehlen den Erythrozyten entscheidende Bausteine der normalen Apoptosemaschinerie, namentlich die Mitochondrien und der Zellkern. Staurosporin, die meisten Zytostatika und Serum-Deprivation (Kultur ohne Serum) lösen bei ihnen keine Apoptose aus, wohl aber bei kernhaltigen Zellen. Daher ging man lange Zeit davon aus, dass rote Blutkörperchen gar nicht zu Apoptose in der Lage sind. Wie erklärt sich dieser Widerspruch?

Gibt man Calcium-Ionophor, ein maximalen Calciumeinstrom auslösendes Agens, auf Erythrozyten, so zeigen sie sehr rasch Phosphatidylserin-Exposition, Zellschrumpfung und bilden Membranvesikel (Blebbing) [Berg et al., 2001]. Bei diesen Vorgängen handelt es sich um wohlbekannte Charakteristika der Apoptose bei kernhaltigen Zellen. Erythrozyten, die Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche zeigen, werden von Makrophagen aufgenommen [Boas et al., 1998; Kiefer und Snyder, 2000] und innerhalb einer Stunde nahezu vollständig aus der Blutbahn entfernt [Schroit et al., 1985]. Außerdem aktiviert der Calcium-Einstrom sog. Calpaine. Dabei handelt es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteasen, die u.a. das Cytoskelett zerlegen und ebenfalls bekanntermaßen eine Bedeutung für die Apoptose haben [Miyoshi et al., 1996; Sorimachi et al., 1997]. Man begann vor einigen Jahren zu erkennen, dass Erythrozyten eben eine besondere Form der Apoptose zeigen [Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001]. Schließlich wurde dafür der Begriff der Eryptose geprägt [Lang et al., 2005a].

Die genaue Abgrenzung zu den Phänomenen der Alterung (Senescence) und der so genannten Neocytolyse (Sterben gerade junger Erythrozyten durch Epo-Abfall [Rice und Alfrey, 2005]) ist bislang noch nicht eindeutig festgelegt [Lang et al., 2006a].

### 1.2.5 Signalwege der Eryptose

Die Eryptose ist also der programmierte Zelltod des Erythrozyten. Wie geht das vor sich? Erythrozyten besitzen zwar einige der bei kernhaltigen Zellen so wichtigen Caspasen, doch liegen sie in inaktiver Form vor [Berg et al., 2001]. Daher ging man bisher davon aus, dass sie keine Rolle spielen [Berg et al., 2001]. Neuere Beobachtungen scheinen allerdings auch eine funktionelle Beteiligung der Caspasen anzudeuten [Mandal et al., 2005; Matarrese et al., 2005]. Dennoch ist ihre Rolle in der Eryptose wohl nicht vergleichbar mit ihrer Bedeutung für die Apoptose kernhaltiger Zellen.

Die entscheidende, gemeinsame Endstrecke der Apoptose beim Erythrozyten ist die Aktivierung des Enzyms Scramblase. Dieses verschiebt Phosphatidylserin auf das äußere Blatt der Doppelmembran und sorgt damit für PS-Exposition [Zhou et al., 2002]. Normalerweise stellt das Enzym Translokase ATP-abhängig sicher, dass Phosphatidylserin nur auf dem inneren Blatt der Zellmembran vorkommt [Seigneuret und Devaux, 1984]. Das so exponierte Phosphatidylserin wird von Makrophagen erkannt, was zur Phagozytose führt [Messmer und Pfeilschifter, 2000; Fadeel, 2004].

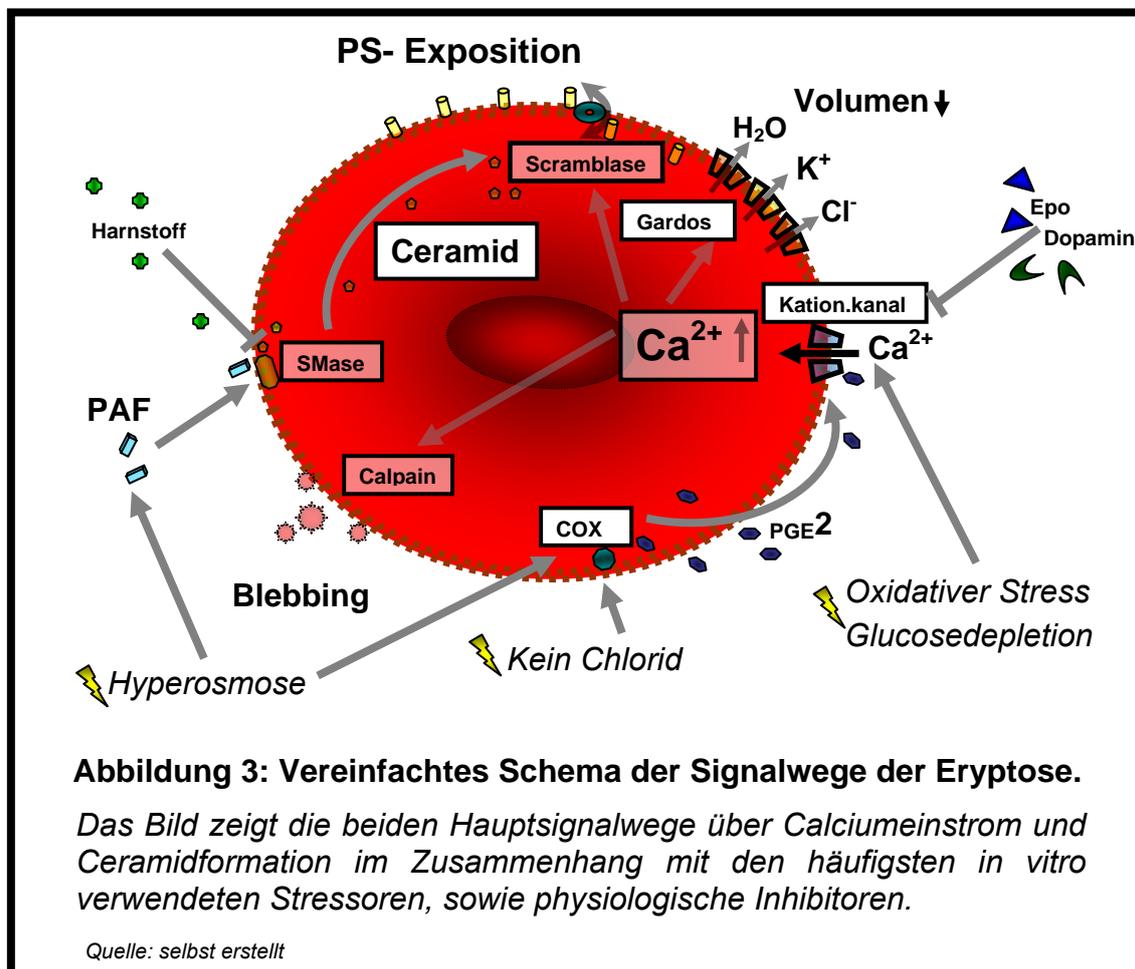
Die Scramblase wird durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert [Woon et al., 1999; Dekkers et al., 2002], gleichzeitig wird die Translokase gehemmt. Dadurch wird Calciumeinstrom in die Zelle zu einem der Hauptsignalgeber der Eryptose. Erhöhtes intrazelluläres Calcium sorgt zugleich auch für die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kalium-Kanäle (Gardos-Kanal), wodurch das Zellvolumen abnimmt [Lang et al., 2003e], da konsekutiv auch Chlorid und Wasser aus der Zelle getrieben werden. Schließlich aktiviert intrazelluläres Calcium die Calpain-Proteasen, welche das Zytoskelett angreifen [Pant et al., 1983].

Die Eintrittspforte des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms sind unspezifische Kationenkanäle [Lang et al., 2003b]. Dieser Kanal ist hemmbar durch Amilorid oder besser noch durch sein Analogon EIPA [Lang et al., 2003c]. Bereits bekannte physiologische Inhibitoren, die auf den Kanal einwirken, sind zum einen Epo [Myssina et al., 2003], das somit also nicht nur Einfluss auf die Blutbildung ausübt, sondern auch das Erythrozytenüberleben reguliert [Polenakovic und Sikole, 1996]. Zum anderen gehören dazu auch die Catecholamine [Lang et al., 2005b]. Letztere

wirken allerdings in nur unphysiologischen Dosen. Gleichwohl wurde gezeigt, dass Dopamin die Hematotoxizität von Cyclophosphamid vermindert [Lakshmi et al., 2005]. Chlorid schließlich ist ein weiterer Inhibitor dieser Kationenkanäle [Huber et al., 2001]. Daher ist die Wegnahme von Chlorid aus dem Medium ein effektiver Eryptose-Stimulus. Dieselben Kanäle werden auch durch oxidativen Stress [Duranton et al., 2002] und schlagartige Erhöhung der Menge gelöster Substanzen im Medium (osmotischer Schock) aktiviert [Lang et al., 2002; Lang et al., 2005a]. Bei hyperosmotischem und chloridfreiem Medium vollzieht sich eine Aktivierung der Cyclooxygenase und damit erfolgt die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> [Kaestner und Bernhardt, 2002; Lang et al., 2005c]. COX-Inhibitoren hemmen die Eryptose in chloridfreiem Medium [Lang et al., 2005c]. PGE<sub>2</sub> stellt also einen entscheidenden Mediator der Eryptose dar. Die Wegnahme von Glucose führt zu einer größeren Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress durch Zusammenbrechen der Glutathion-Regeneration und damit ebenfalls zur Eryptose [Mavelli et al., 1984; Lang et al., 2002]. Weiterhin ist Aktivierung der Proteinkinase C am erhöhtem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Glucose-Depletion beteiligt [Andrews et al., 2002; Klarl et al., 2006]. Oxidativer Stress aktiviert zusätzlich weitere Signalwege, etwa die Caspasen [Matarrese et al., 2005].

Ein zweiter Signalweg zur Anregung der PS-Exposition ist die Bildung von Ceramid [Lang et al., 2004a; Lang et al., 2005d]. Ceramid ist auch bei der Apoptose kernhaltiger Zellen involviert, wo es vor allem auf die Mitochondrien wirkt [Goldkorn et al., 1998; Frago et al., 1998; Woodcock, 2006]. Der genaue Mechanismus beim Erythrozyten ist noch unklar, möglicherweise wird die Scramblase durch Ceramid für intrazelluläres Calcium sensitiviert [Lang et al., 2004a]. Platelet activating factor, der auch von der Zelle selbst bei Hyperosmolarität ausgeschüttet wird, löst Eryptose Ceramid-vermittelt und Calcium-unabhängig aus [Lang et al., 2005d; Lang et al., 2006b]. Die Aktivierung der Sphingomyelinase, welche Ceramid aus dem Sphingomyelin der Zellmembran generiert, kann zumindest im Falle des osmotischen Schocks durch Harnstoff gehemmt werden [Lang et al., 2004b]. Das Zusammenspiel der Hemmung von Chlorid (Kationenkanal) und Harnstoff (SMase) erklärt auch, warum

Erythrozyten bei der normalen Nierenpassage nicht in die Apoptose getrieben werden [Lang et al., 2005a].



In jüngster Zeit wurde die PS-Exposition durch die Aktivierung von Membranrezeptoren wie CD47 und Glycophorin-Rezeptor gezeigt [Head et al., 2005a; Head et al., 2005b]. Das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Mediatoren und das höchst wahrscheinliche Vorhandensein weiterer Signalwege muss durch weitere Forschungsanstrengungen aufgeklärt werden [Lang et al., 2006a].

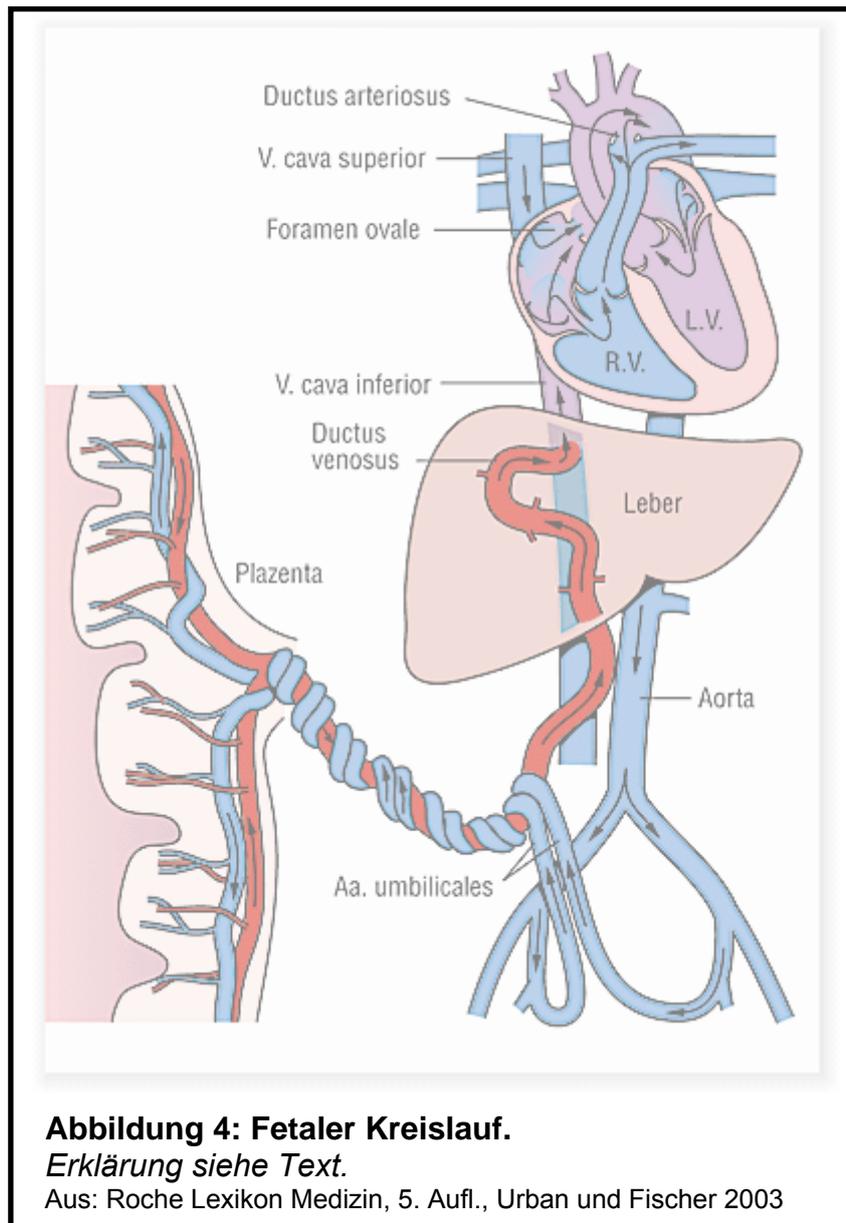
### 1.2.6 Vorkommen und Bedeutung der Eryptose

Der Calcium-Einstrom durch Calcium-Ionophor oder die Aktivierung des Kationenkanals durch Chloridwegnahme stellen an und für sich unphysiologische Stimuli dar. Dennoch ist anzunehmen, dass die Eryptose bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle spielt [Lang et al., 2006a]. Bei Thalassämie, Sichelzellenanämie und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Mangel wird eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer beobachtet. Diese ist zumindest teilweise durch Eryptose bedingt [Lang et al., 2002]. Dasselbe gilt für die verkürzte Lebensspanne der Erythrozyten bei der Eisenmangelanämie [Kempe et al., 2006] oder bei Phosphatmangel [Birka et al., 2004]. Auch die Anämien bei verschiedenen Schwermetallvergiftungen könnten durch die beobachtete höhere Eryptose bedingt sein [Kempe et al., 2005; Eisele et al., 2006; Niemoeller et al., 2006b]. Weiterhin wurde für einige Medikamente eine höhere Eryptose nachgewiesen, was auf einen Zusammenhang hindeutet [Akel et al., 2006; Niemoeller et al., 2006a; Lang et al., 2006e]. Oxidativer Stress, der wie bereits erwähnt Eryptose auslöst, spielt eine Rolle bei zahlreichen Erkrankungen, darunter auch HIV [Repetto et al., 1996]. Eryptose scheint im Übrigen ein Teil der komplexen Pathophysiologie von Krankheiten wie dem Hämolytisch-urämischem-Syndrom [Lang et al., 2006d] oder der Sepsis zu sein. Hier könnte auch die stärkere Endotheladhäsion der betroffenen Erythrozyten nach PS-Exposition [Gallagher et al., 2003] involviert sein, welche unter Umständen eine Rolle für Mikrozirkulation und Hämostase spielt [Andrews und Low, 1999]. Einen protektiven Faktor stellt Eryptose vermutlich bei Malaria dar, da infizierte Erythrozyten PS exponieren und damit aus der Blutbahn entfernt werden [Brand et al., 2003; Durantou et al., 2004]. Allerdings versucht sich der Erreger dagegen zu schützen, indem er  $\text{Ca}^{2+}$  aufnimmt [Lang et al., 2006a]. Schließlich wurde gezeigt, dass Erythrozyten auf Hämolysine mit Eryptose reagieren [Lang et al., 2004c]. Dies weist auf die eigentliche physiologische Hauptrolle der Eryptose hin, welche darin besteht, Hämolyse zu vermeiden [Lang et al., 2006a].

## 1.3 Physiologie des Ungeborenen

### 1.3.1 Der fetale Kreislauf

Im Fetus wird der Sauerstoff nicht in der Lunge aus der Luft aufgenommen, sondern aus dem mütterlichen Blut in der Plazenta. Daher erreicht das arterialisierte fetale Blut lediglich  $pO_2$ -Werte ähnlich wie in mütterlichem venösen Blut [Soothill et al., 1986]. Von der Plazenta fließt das Blut über die Nabelschnurvene zum Fetus, wo es über den Ductus venosus an der Pfortader vorbei geführt wird und schließlich über die Hohlvene zum rechten Herzen gelangt. Schon in der Hohlvene wird das arterialisierte Blut mit venösem Blut aus der unteren Körperhälfte vermischt, weiterhin im rechten Vorhof mit venösem Blut aus der oberen Körperhälfte. Dieses Mischblut wird nun über das Foramen ovale, welches eine Verbindung zur linken Herzhälfte herstellt, und über den Ductus arteriosus, welcher Truncus pulmonalis und Aorta verbindet, größtenteils am weitgehend überflüssigen Lungenkreislauf vorbeigeführt. In diesem herrscht ein dem systemischen Kreislauf vergleichbarer Druck, da die Lunge noch nicht entfaltet ist, was den Durchfluss zusätzlich verringert [Kiserud, 2005]. Von den inneren Beckenarterien schließlich gehen die Nabelarterien ab, die das sauerstoffarme Blut der Plazenta zuführen. Nach der Geburt wird der fetale Kreislauf innerhalb kurzer Zeit durch Abnabelung und Lungenentfaltung mit folgendem Verschluss der Shunts auf den Modus des Erwachsenen umgestellt. Dadurch ändern sich auch schlagartig die  $O_2$ -Konzentrationen.



Ein erheblicher Teil des fetalen Blutvolumens zirkuliert im Mutterleib außerhalb des Körpers in der Plazenta und den Nabelgefäßen. In welchem Ausmaß dieser Anteil nach der Geburt dem Kreislauf des Neugeborenen zugeführt wird, ist stark abhängig vom Zeitpunkt der Abnabelung [Mercer und Skovgaard, 2002].

### 1.3.2 Fetale Erythrozyten und fetales Blut

Hält man sich die essentielle Bedeutung des „Organs“ Blut vor Augen, überrascht es wenig, dass die Blutbildung bereits einige Tagen nach Beginn der intrauterinen Entwicklung beginnt. Die erste, noch primitive Blutbildung erfolgt

im Dottersack und damit außerhalb des eigentlichen Embryos. Die ersten Erythrozyten sind noch fünf- bis sechsmal größer als adulte Zellen ( $> 400$  fl MCV). Ähnlich den Erythrozyten von Vögeln, Fischen und Reptilien enthalten sie überdies einen Zellkern [McGrath und Palis, 2005]. Bei dem in diesen Zellen enthaltenen Hämoglobin handelt es sich vorwiegend um Hb Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) [Peschle et al., 1985; He und Russell, 2001]. Diese so genannte „primitive“ Blutbildung wird nach wenigen Wochen durch die „definitive“ Blutbildung abgelöst, welche in ihren wesentlichen Eigenschaften auch der adulten Blutbildung zugrunde liegt [Peschle et al., 1984; Tavian und Peault, 2005]. Die Erythrozyten sind nun wesentlich kleiner (ca. 120 fl/Zelle) und meist kernlos [Forestier et al., 1986]. Der Hauptort der Blutbildung verschiebt sich zur kindlichen Leber. Eine erste Umstellung des Hämoglobin-Typus wird vorgenommen und die Erythrozyten enthalten jetzt vorwiegend HbF. Ab ungefähr dem letzten Schwangerschaftsdrittel beginnt die Blutbildung im Knochenmark, wobei die Leber noch bis nahe an den Geburtstermin dominierend bleibt [Palis und Segel, 1998]. Nach der Geburt findet die Hämatopoese fast ausschließlich im Knochenmark statt. Die hepatische Erythropoese kann jedoch in bestimmten Situationen reaktiviert werden, wenn das Knochenmark keine ausreichende Blutbildung sicherstellen kann (z.B. bei Osteomyelofibrose durch Knochenmarks-Insuffizienz).

Fetale Erythrozyten sehen sich einer anderen Umwelt gegenüber als adulte Erythrozyten. Daher ist es wenig erstaunlich, dass sie sich in einigen Charakteristika unterscheiden. Fetale Erythrozyten erhalten ihren Sauerstoff nicht wie adulte aus der Luft, sondern müssen ihn ihrerseits den Erythrozyten der mütterlichen Blutbahn entreißen. Um also im niedrigeren Sauerstoffpartialdruck der Plazenta Sauerstoff von den maternalen Erythrozyten übernehmen zu können, brauchen die fetalen Erythrozyten eine höhere Affinität zu Sauerstoff. Fetale Zellen enthalten überwiegend das fetale Hämoglobin (HbF) [Egberts und Van Pelt, 2004], welches sich aus zwei  $\alpha$ -Ketten und zwei  $\gamma$ -Ketten zusammensetzt. Das fetale Hämoglobin weist eine geringere Affinität zu 2,3-Di-phosphoglycerat auf, welches normalerweise die  $O_2$ -Bindungskurve des Hämoglobins nach rechts (schwächere Affinität) verschiebt [Bauer et al., 1968]. Auch der Gehalt an

2,3-DPG ist bei fetalen Zellen etwas geringer [Oski, 1969]. So wird den fetalen Zellen ermöglicht, auch unter diesen Bedingungen oxygeniert zu werden. Bei Erwachsenen spielt dementsprechend HbF kaum noch eine Rolle, da es nur ca. 2 % des gesamten Hämoglobins ausmacht [Bank, 2006]. Fetales Hämoglobin hat eine möglicherweise auch eine Funktion bei der Temperaturregulation des Feten, da es Wärmeabgabe an den mütterlichen Kreislauf unterstützt. [Giardina et al., 1993].

Die Größenverteilung fetaler und adulter Erythrozyten ist nicht identisch. Fetale Zellen sind wesentlich größer als adulte Zellen [Alter et al., 1988] und weisen überdies eine geringfügig größere osmotische Resistenz auf [Serrani et al., 1989]. Allerdings ist ihre mechanische Stabilität etwas kleiner [Linderkamp et al., 1993]. Daneben finden sich zahlreiche weitere Abweichungen im Stoffwechsel (Aktivität der glycolytischen Enzyme [Gahr, 1980]), der Zusammensetzung (Lipidverteilung [Crowley et al., 1965]) oder Membrantransport ( $K^+$ -Transport [Gibson et al., 2001]), um nur einige Beispiele zu nennen. Schließlich enthält fetales Blut eine hohe Anzahl an Stammzellen, weshalb man heute versucht, Nabelschnurblut als mögliche Alternative zu Knochenmarktransplantationen zu etablieren [Ballen, 2005].

### **1.3.3 Umstellung nach der Geburt**

Neugeborene haben sehr hohe Hämoglobinwerte von ca. 18 g/dl. Dies ist erforderlich, um die relativ zum extrauterinen Zustand geringere Sauerstoffsättigung auszugleichen. Der hohe Hb-Wert und der gleichzeitige Anstieg der Sauerstoffsättigung nach der Geburt sorgen für einen massiven Abfall der Epo-Produktion [Halvorsen und Finne, 1968]. Primärer Produktionsort des Erythropoietin ist dabei zunächst noch die Leber [Dame et al., 1998]. Durch den Mangel an Epo reduziert sich auch die Erythropoese, was sich in einem Absinken des Hb-Wertes und der Retikulozytenzahlen manifestiert. Nach ungefähr zwei bis drei Monaten erreicht dieser Vorgang mit Hb-Werten um 11 g/dl seinen Tiefpunkt. Dies ist die so genannte Trimenonreduktion. Diese „physiologische Anämie“ ist dabei von echten Anämien zu unterscheiden. Bei

Frühgeborenen wird dieser Zustand oft aggraviert, so dass ein Absinken des Hämoglobins bis auf Werte um 7-10 g/dl vorkommt und Epo-Substitution erforderlich wird [Shannon et al., 1987]. Diese Therapie hat jedoch keinen Einfluss auf die Umstellung von fetalem auf adultes Hämoglobin [Bard und Widness, 1995]. Nach der Trimenonreduktion setzt wieder eine stärkere Epo-Produktion ein und der Hb-Wert steigt langsam wieder an. Kinder haben dann jedoch unerheblich niedrigere Hb-Werte als Erwachsene.

Nabelschnurblut enthält noch größtenteils fetales HbF [Armstrong et al., 1963]. Bereits vor der Geburt beginnt die Produktion von HbA, die jedoch vor allem nach der Geburt stark ansteigt. Gleichzeitig wird die Produktion von HbF drastisch herunterreguliert [Stamatoyannopoulos et al., 1987]. Der Anteil des fetalen Hb sinkt daher um etwa zwei bis drei Prozent pro Woche ab. Nach vier Monaten werden Hämoglobin-A-Werte wie beim Erwachsenen erreicht, die Umstellung ist somit abgeschlossen [Metaxotou-Mavromati et al., 1982].

### **1.4 Zielsetzung**

Wie bereits ausgeführt unterscheiden sich die Umwelt und damit auch die Anforderungen an den fetalen Erythrozyten in vielen Punkten von der Situation bei adulten Zellen. Es überrascht daher nur wenig, dass die Physiologie nicht identisch ist. Beispielsweise ist bekannt, dass fetale Erythrozyten eine im Vergleich höhere Aktivität des  $K^+Cl^-$  Cotransporters (KCC - dient der Volumenregulation) in der Zellmembran aufweisen [Gibson et al., 2001]. Wie frühere Beobachtungen zeigen, ist der Kaliumtransport auch bei der Eryptose bedeutsam [Lang et al., 2003e]. Fetale Erythrozyten zeigen sich weiterhin auch empfindlicher gegenüber oxidativem Stress [Bracci et al., 2002], von welchem bekannt ist, dass er Eryptose auslöst. Weiterhin könnte Eryptose vom Hämoglobintyp beeinflusst sein, da bei Sichelzellenanämie oder Thalassämien eine höhere PS-Exposition nachgewiesen wurde [Lang et al., 2002]. Es gibt also einige Unterschiede zwischen fetalen und adulten Zellen, die auf einen möglichen Unterschied im Eryptose-Verhalten hindeuten.

Die Lebensspanne der Erythrozyten beim Neugeborenen beträgt ungefähr 60-80 Tage [Pearson, 1967]. Damit leben sie also wesentlich kürzer als adulte Erythrozyten. Die radikalen Umstellungen um den Geburtstermin herum sorgen für den physiologischen Austausch nahezu der kompletten Erythrozytenpopulation eines Organismus in relativ kurzer Zeit. Diese Umstellung erfolgt so schnell, dass Neugeborene sogar eine ikterische Phase durchlaufen. Möglicherweise stellt der programmierte Zelltod des Erythrozyten einen gewichtigen Faktor zur Erklärung dieser Vorgänge dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Reaktion fetaler Erythrozyten auf verschiedene Eryptose-Stimuli, um damit Aufschluss über das Eryptoseverhalten dieser besonderen Erythrozytenpopulation zu erhalten. Dabei sollte zunächst festgestellt werden, ob fetale Erythrozyten überhaupt Eryptose zeigen und wenn ja, welche Faktoren hier von Bedeutung sein könnten.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Erythrozyten**

Erythrozyten lassen sich nicht in Zellkultur vermehren, da sie sich nicht teilen können. Sie müssen also aus menschlichen Spendern gewonnen werden. Die Ethik-Kommission hat die vorliegende Studie nach eingehender Prüfung genehmigt (Projekt Nummer 184/2003V). Die adulten Zellen wurden hierfür gesunden Freiwilligen entnommen, welche ihre Zustimmung durch Unterschrift unter eine Informations- und Einwilligungserklärung dokumentierten. Die fetalen Erythrozyten in Form von Nabelschnurblut wurden direkt nach der Geburt aus der Plazenta entnommen. Die nötige Zustimmung der Mutter wurde eingeholt und gleichfalls schriftlich dokumentiert. Nach der Entnahme erfolgte die Abtrennung des Plasmas von den Blutzellen durch vorsichtige Zentrifugation bei 4000 g und 22 °C für fünf Minuten. Anschließend wurden die Erythrozyten möglichst ohne Zeitverlust verarbeitet. Für die Versuche wurden die Zellen, sofern nicht anders angegeben, mit einem Hämatokrit von 0,3 % in der jeweiligen Lösung bei 37 °C inkubiert.

### **2.2 Verwendete Lösungen**

Die angegebenen Stoffe für alle in der Zellkultur beteiligten Lösungen wurden in sterilem Aqua bidest gelöst. Durch Titration mit NaOH und HCl auf pH 7,4 sollte ein physiologischer pH-Wert eingestellt werden. Die Osmolarität musste (außer bei der hyperosmolaren Lösung) in einem physiologischen Bereich zwischen 280 und 320 mosm liegen. Die Überprüfung erfolgte mit Hilfe eines Osmometers (Modell Vapro 5520 der Firma Wescor, Logan, UT, USA). Abschließend wurden die Lösungen steril filtriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Erythrozyten wurden dann in der jeweiligen Lösung für die angegebene Zeit bei 37 °C inkubiert.

### 2.1.1 Ringerlösung

Die Ringerlösung soll für den Erythrozyten eine möglichst stressarme Umgebung bieten und ihn mit dem Lebensnotwendigen versorgen. Anders als kernhaltige Zellen ist er nicht von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren abhängig. Daher enthält Ringerlösung nur die wichtigsten Elektrolyte, Glucose und HEPES als Puffer, um den pH konstant zu halten. Ringerlösung dient als Standard für die meisten Experimente, insbesondere für die Kontrollen, wenn nicht anders angegeben. In Ringer zeigen Erythrozyten nur wenig spontane Eryptose.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Ringerlösung.**

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

### 2.1.2 Chloridfreie Lösung

Eine Möglichkeit, Eryptose auszulösen, stellt die Wegnahme von Chlorid aus dem Medium dar, da hierdurch der unselektive Kationenkanal aktiviert wird und ein Calciumeinstrom erfolgt. Dazu wird Chlorid durch Gluconat ersetzt. Nach einem Zeitraum von 24 Stunden in chloridfreiem Medium zeigt ein großer Teil der Erythrozyten bereits Eryptose.

**Tabelle 2: Chloridfreie Lösung.**

Substanz	Konzentration (mM)
Na-Gluconat	125
Kalium-Gluconat	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
Glucose	5
Ca-(Gluconat) <sub>2</sub>	1

### 2.1.3 Hyperosmolare Lösung

Ein weiterer möglicher Stressor für Erythrozyten ist eine zu hohe Osmolarität. Hebt man die Osmolarität durch Zugabe einer entsprechenden Menge Sucrose auf 700 mosm an, so wird nach Inkubation von 24 Stunden bei einem großen Teil der Erythrozyten Eryptose nachweisbar. Die richtige Osmolarität wurde zuvor ebenfalls osmometrisch kontrolliert.

**Tabelle 3: Hyperosmolare Lösung.**

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
Glucose	5
CaCl <sub>2</sub>	1
Sucrose	400

### 2.1.4 Glucosefreie Lösung

Eryptose wird weiterhin durch das völlige Fehlen von Glucose im Medium ange-regt. Dadurch sieht sich der Erythrozyt außer Stande, über die Glycolyse Energie für den Zellstoffwechsel bereitzustellen und über den Pentosephos-phatweg NADPH für die Abwehr von oxidativem Stress zu gewinnen. Vor allem

letzteres führt zu Eryptose. Das Fehlen der Glucose wird im Medium durch eine unerhebliche Menge zusätzlichen Natriumchlorids ausgeglichen. In dieser Lösung werden die Erythrozyten für 48 Stunden inkubiert.

**Tabelle 4: Glucosefreie Lösung.**

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	127,5
KCl	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
CaCl <sub>2</sub>	1

### 2.3 Verwendete Substanzen

Alle Substanzen wurden in den jeweils angegebenen Konzentrationen in Ringerlösung eingesetzt. Die Konzentration der Lösungsvermittler blieb dabei unter 0,1 %. Die Konzentrationsangaben im Ergebnisteil beziehen sich auf die Endkonzentration, der die Erythrozyten ausgesetzt sind.

Prostaglandin E<sub>2</sub>, bezogen von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland), ist ein durch die Cyclooxygenase aus Arachidonsäure hergestellter körpereigener Botenstoff, der neben unzähligen anderen Funktionen Einfluss auf Schmerz und Entzündungsvorgänge ausübt. Darüber hinaus wurde seine Bedeutung auch für die Eryptose erkannt [Lang et al., 2005c]. Als Solvens diente Ethanol.

Platelet activating factor (1-O-hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine oder PAF-16), ist ein im Körper von verschiedenen Zellen produziertes Phospholipid, welches unter anderem eine Rolle als Entzündungsmediator und Gerinnungsaktivator spielt [Stafforini et al., 2003]. Daneben wurde auch seine wichtige Rolle für die Eryptose gezeigt [Lang et al., 2005d]. PAF wurde von Calbiochem (Schwalbach, Deutschland) bezogen. Als Lösungsvermittler kam DMSO zum Einsatz.

Tert-Butylhydroxiperoxid (TBHP) sorgt über seine Peroxidgruppe für die Bildung aggressiver Radikale und bewirkt damit starken oxidativen Stress. TBHP wurde bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) gekauft.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, in kurzer Zeit eine große Anzahl von Zellen, die frei in Flüssigkeit schwimmen, zu analysieren. Diese werden aus dem Messröhrchen angesaugt und beschleunigt. Durch laminare Flüssigkeitsströme gelingt es, sie perlschnurartig so zu fokussieren, dass immer nur ungefähr eine Zelle gleichzeitig den Messbereich passiert. Dort wandert sie durch das Licht eines Lasers definierter Wellenlänge, wodurch Streulicht entsteht, welches dann durch Photodetektoren registriert wird. Dabei gibt das parallel zur Einstrahlrichtung des Lasers abgestrahlte Streulicht Auskunft über die Größe der Zelle (sog. forward scatter) und das seitlich abgestrahlte Streulicht erlaubt Rückschlüsse auf die Beschaffenheit, da stärkere z. B. Granulation mehr Streulicht erzeugt (sog. sideward scatter). Gleichzeitig werden die Zellen, die den Analysepunkt passieren, gezählt.

Üblicherweise wird die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (von „Fluorescence Activated Cell Sorter“) mit einer bestimmten Fragestellung verbunden. Die Zellen werden dazu in irgendeiner Form mit einer fluoreszierenden Substanz markiert. Ein Beispiel hierfür wäre ein mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper gegen ein Membranprotein. Dieser Farbstoff wird beim Durchtritt durch den Laser aktiviert und beginnt nun zu fluoreszieren, d.h. Licht bestimmter Wellenlänge zu emittieren. Dieses kann nun von weiteren Photodetektoren, die für bestimmte Wellenlängen empfindlich sind, aufgefangen werden. Durch dieses getrennte Auffangen und die Verwendung mehrerer Laser unterschiedlicher Wellenlänge ist es möglich, Doppelfärbungen mit Farbstoffen unterschiedlicher Intensität in verschiedenen Wellenlängen durchzuführen, um gleichzeitig zwei Eigenschaften an einer Zelle getrennt zu prüfen (beispielsweise das gemeinsame Auftreten zweier Membranproteine). Die Signale der Photodetektoren werden digitalisiert und können nun analysiert werden.

### 2.4.2 Annexin-Messung

Ziel der Annexin-Messung ist der Nachweis der Phosphatidylserin-exponierenden Zellen als Anhaltspunkt für Apoptose. Dies gelingt durch Färbung mit synthetischem, fluoreszenzmarkiertem Annexin V, einem erstmals in der Gefäßwand entdeckten Protein mit gerinnungshemmenden Eigenschaften [Reutelingsperger et al., 1985]. Dieses Protein bindet selektiv an Phosphatidylserin [Andree et al., 1990; Vermes et al., 1995]. Um die Bindung durchflusszytometrisch nachzuweisen, wird das Annexin mit dem Fluorochrom Fluoreszein-isothiocyanat konjugiert. Zur Verwendung kam das Annexin-V-Fluos der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland).

Nach Inkubation in der jeweiligen Lösung wurden je 100 µL der Erythrozyten-Suspension mit Annexin-Bindepuffer gewaschen. Dieser Schritt ist erforderlich, da Annexin nur in Anwesenheit von Calcium an Phosphatidylserin bindet. Nach dem Waschvorgang wurden die Erythrozyten in mit Annexin-Bindepuffer verdünntem Annexin-V-Fluos (1:50) resuspendiert und für 10 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Nach einer erneuten Verdünnung der Proben mit Annexin-Bindepuffer (1:5) wurden je 20.000 Zellen in einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) im forward scatter sowie im FL-1-Kanal (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 530 nm) gemessen. Höhere Fluoreszenz in diesem Bereich wurde als Anhaltspunkt für Annexin-Bindung und somit für eine Phosphatidylserin-Exposition genommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest-Software der Firma Becton Dickinson.

**Tabelle 5: Annexin-Bindepuffer (pH 7,4).**

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	125
HEPES	10
CaCl <sub>2</sub>	5

### 2.4.3 Intrazelluläre Calcium-Messung

Nach einem ähnlichen Prinzip gelingt der Nachweis einer Zunahme des intrazellulären Calciums [Andrews et al., 2002]. Verwendung findet dabei der

Farbstoff Fluo-3, der selektiv Calcium-Ionen bindet und daraufhin stärker fluoresziert [Minta et al., 1989]. Bei den unstimuliert niedrigen Calciumspiegeln in der Zelle ist er kaum aktiv. Um aber sicher zu stellen, dass nur intrazelluläres Calcium zu Fluoreszenz führt, wird der Farbstoff mit einer Acetoxymethyl-Gruppe verestert. Dieses Molekül ist membrangängig, aber unempfindlich für Calcium. Nach Passage der Zellmembran spalten intrazelluläre Esterasen die Estergruppe wieder ab und der Farbstoff wird intrazellulär bei Anstieg der Calcium-Konzentration wirksam.

Die Erythrozyten mussten zuerst mit Farbstoff beladen werden. Dazu wurde der Farbstoff Fluo-3/AM (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) aus einer Stocklösung (2 mM in DMSO) zu einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{M}$  in eine Erythrozytensuspension in Ringer (Hämatokrit 3 %) zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurden die Erythrozyten bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert bis eine erneute Farbstoffzugabe auf eine Gesamtkonzentration von 8  $\mu\text{M}$  erfolgte. Die Erythrozyten wurden nun für weitere 25 Minuten inkubiert, um eine ausreichende intrazelluläre Farbstoffsättigung sicherzustellen. Der extrazellulär verbliebene Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen der Erythrozyten in PBS (enthaltend 1 % Rinderserumalbumin, Sigma, Taufkirchen) entfernt. Die farbstoffbeladenen Erythrozyten wurden dann bei einem Hämatokrit von 0,16 % in Ringer oder chloridfreier Lösung unter Lichtausschluss für 6 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle und zur Überprüfung ausreichender Farbstoffbeladung wurde eine Positivkontrolle beladener Zellen in Ringer mit 1  $\mu\text{M}$  des Calcium-Ionophors Ionomycin (Sigma, Taufkirchen) inkubiert. Die Messung intrazellulärer Calciumzunahme erfolgte durchflusszytometrisch im FL-1-Kanal (Exzitation 488 nm, Emission 530 nm) durch Analyse von jeweils 20.000 Zellen. Direkt vor der Messung wurden die Erythrozytensuspensionen 1:5 mit Ringer verdünnt.

### **2.4.4 Ceramid-Messung**

Eine weitere Messung, die sich der Durchflusszytometrie bedient, ist die hier verwendete Form der Ceramid-Messung [Grassme et al., 2002; Bieberich et al.,

2003]. Diese bedient sich eines monoklonalen Antikörpers (aus der Maus) gegen Ceramid (clone MID 15B4, Alexis, Grünberg, Deutschland), der auf Ceramid auf der Zelloberfläche bindet. An diesen Antikörper wird ein zweiter FITC-konjugierter polyklonaler Antikörper von der Ziege (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) gebunden, der gegen Antikörper der Maus gerichtet ist. Die Fluoreszenz des FITC wird dann mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Erythrozyten wurden in Ringer bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend werden je 100 µL Zellsuspension mehrfach in Waschpuffer (PBS mit 1 % FCS) gewaschen und anschließend mit Anti-Ceramid-Antikörper (1 µg/mL) in einer Verdünnung von 1:5 mit Waschpuffer bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit Puffer zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wurde der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min bei 4 °C inkubiert. Wiederum musste ungebundener sekundärer Antikörper durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Nach Resuspension in 300 µL Ringer konnten 20.000 Zellen nun durchflusszytometrisch im FL-1 analysiert werden. Als Positivkontrolle wurde Sphingomyelinase (aus *Streptomyces spec.*, Sigma, Taufkirchen) mit einer Konzentration von 1 unit/mL verwendet. Die Auswertung erfolgte erneut mit CellQuest.

### **2.4.5 PGE<sub>2</sub>-Bestimmung**

Prostaglandin E<sub>2</sub> wurde nach dem Prinzip des kompetitiven Enzym-Immuno-Assays bestimmt. Hier macht man sich wiederum die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, selektiv an Antigen binden zu können. In unserem Fall wird synthetisch hergestelltes PGE<sub>2</sub> mit einem Enzym gekoppelt. Dieses künstliche PGE<sub>2</sub> konkurriert mit dem zu messenden „natürlichen“ PGE<sub>2</sub> um die Bindungsstelle an einer definierten Menge Antikörper gegen PGE<sub>2</sub>. Je mehr PGE<sub>2</sub> in der Probe vorkommt, umso weniger enzymkonjugiertes PGE<sub>2</sub> wird an den Antikörper gebunden. Das Gemisch wird anschließend auf eine Platte übertragen, auf der ein Antikörper verankert ist, der den Antikörper gegen PGE<sub>2</sub> bindet. Die ungebundenen Substanzen werden jetzt entfernt. Dann gibt man Substrat für das Enzym hinzu, welches an das synthetische PGE<sub>2</sub> gekoppelt wurde und

lässt das Enzym für eine definierte Zeit Substrat umsetzen. Das Produkt des Enzyms lässt sich photometrisch nachweisen. Je mehr das zu messende PGE<sub>2</sub> das synthetische PGE<sub>2</sub> von den Bindungsstellen verdrängt hat, umso weniger Produkt kann das Enzym produzieren. Die genaue Konzentration wird über Standardreihen definierten Mengen an unkonjugiertem abschätzbar.

Im Einzelnen wurden hierfür jeweils eine Milliarde Erythrozyten für die angegebenen Zeiträume in Ringer bzw. chloridfreier Lösung inkubiert. Durch Zentrifugation bei 450 g und 4 °C wurden die Erythrozyten vom Überstand getrennt und letzterer bei -20 °C aufbewahrt. Die PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe eines fertigen Correlate-EIA<sup>TM</sup> Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay Kit von Assay Designs Inc. (Ann Arbor, MI, USA) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 1:2,5 mit dem Assay-Puffer verdünnt. Dann wurden 100 µL der zu untersuchenden Probe zusammen mit 50 µL mit alkalischer Phosphatase konjugiertem PGE<sub>2</sub> und 50 µL monoklonalem PGE<sub>2</sub>-Antikörper vermischt und auf Mikrotiter-Platten übertragen, die mit Anti-Maus-Antikörper (IgG) der Ziege beschichtet sind. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Waschen ungebundenes Substrat entfernt. Anschließend wurden 200 µL p-Nitrophenylphosphat als Substrat für die alkalische Phosphatase zugegeben und für 45 Minuten belassen. Durch einen Mikroplattenreader wurde die optische Dichte bei 405 nm gemessen und über die parallel durchgeführte Standardkurve (39,1-5000 pg/mL) einer PGE<sub>2</sub>-Konzentration zugeordnet. Die Werte der durch chloridfreie Lösung stimulierten Proben sind in Prozent der Kontrollen (Ringer) ausgedrückt.

### **2.4.6 Patch-clamp**

Patch-clamp nach Hamill [Hamill et al., 1981] ist eine Methode der Elektrophysiologie, die es ermöglicht, die Aktivität von Ionenkanälen direkt zu beobachten. Dabei wird eine Glaspipette so ausgezogen, dass ihre Spitze eine Öffnung von weniger als einem tausendstel Millimeter aufweist. Sie wird mit Elektrolytlösung gefüllt (s.u.). Diese Spitze wird auf ein Membranstück einer Zelle (engl. patch = Fleck) aufgesetzt und durch Anlegen eines leichten

Unterdrucks fixiert. Dadurch entsteht zwischen Glas und Zellmembran ein großer Abdichtwiderstand, das so genannte Gigaseal. Dieser Widerstand, der im Bereich von über  $1\text{ G}\Omega$  liegen sollte, sorgt dafür, dass Ladung nun fast nur durch die Ionenkanäle der Zellmembran fließen kann und wenig Hintergrundaktivität als Rauschen auftritt. Es gibt verschiedene Konfigurationen des patch-clamp, abhängig davon, welcher Membranabschnitt untersucht wird. Bei der so genannten whole-cell-Methode wird durch stärkeren Unterdruck oder einen kurzen Spannungspuls das Membranstück in der Pipettenspitze zerstört, wodurch ein Zugang zum Zellinneren entsteht. Die abgeleitete Potentialdifferenz bezieht sich also auf die ganze Zelle. Patch-clamp bedient sich des Grundprinzips der Voltage-clamp-Methode. Dabei wird durch zwei Elektroden die Potentialdifferenz an einer Zellmembran durch einen Strom fixiert („geklemmt“, engl. clamp = Klemme). Um eine Änderung des Membranpotentials zu unterbinden, wird ein Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt. Dieser Strom wird in einem negativen Rückkopplungsmechanismus dem an der Zellmembran vorkommendem Strom entgegen gerichtet. Ändert sich die Leitfähigkeit der Membran, so ändert sich auch der zum Erhalt der vorgegebenen Sollspannung nötige Kompensationsstrom, was gemessen werden kann. Beispielsweise durch Öffnung von Ionenkanälen entstehen winzige Ströme im pA- Bereich, die durch die empfindliche Apparatur aufgefangen werden. Um die tatsächlich wirksamen Spannungen an der Zellmembran messen zu können, werden Offset-Potentiale zwischen den Elektroden und liquid-junction-Potentiale nach Barry und White [Barry und Lynch, 1991] noch vor Beginn der Messung korrigiert. Liquid-junction-Potentiale entstehen im Grenzbereich zweier Lösungen, die unterschiedlich mobile Ionen enthalten.

Die Patch-Pipetten, Glaskapillaren aus Borosilikat-Glas (150 TF-10, Clark Medical Instruments, Pangbourne, Großbritannien), wurden mit Hilfe eines mikroprozessorgetriebenen DMZ Pullers (Zeitz, Augsburg, Deutschland) hergestellt. Die Pipetten hatten  $8\text{-}12\text{ M}\Omega$  Spitzenwiderstand und wurden durch Ag-AgCl-Draht an einen EPC 9 Patch-clamp-Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) angeschlossen und die Ströme unter Verwendung der Pulse Software (Heka)

an einem Computer mit ITC-16 Interface (Instrutech, Port Washington, N.Y., USA) aufgezeichnet. Die Zellen wurden kontinuierlich superfundiert und das Bad über eine NaCl-Ringer-Brücke geerdet. Das liquid-junction-Potential zwischen Bad- und Pipettenlösung sowie zwischen Badlösung und der NaCl-Ringerbrücke wurden nach Barry und White korrigiert und die Offsetpotentiale der Elektroden vor der Messung auf Null gebracht. An die Erythrozyten wurde ein Haltepotential von -20 bis -30 mV angelegt und 200 oder 400 ms lange Pulse von -100 bis +80 mV in Stufen von 20 mV gegeben. Die Originalbilder der Ganzzellströme sind ohne Filterung dargestellt (Aufzeichnungsfrequenz 5 Hz). Die Ströme wurden durch Bildung des Durchschnittswerts zwischen 350 und 375 ms jedes Rechteckimpulses (I-V Verhältnis) analysiert. Die Potentiale beziehen sich auf die cytoplasmatische Seite der Zellmembran im Verhältnis zum Extrazellulärraum. Einwärts gerichtete Ströme, definiert als Bewegung positiver Ladung von der extrazellulären zur cytoplasmatischen Seite der Zellmembran, werden als negative Ströme angegeben (als Abweichungen nach unten dargestellt). Die Badlösung bestand entweder aus Ringerlösung oder chloridfreier Lösung (siehe oben).

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Pipettenlösung (pH 7,4).**

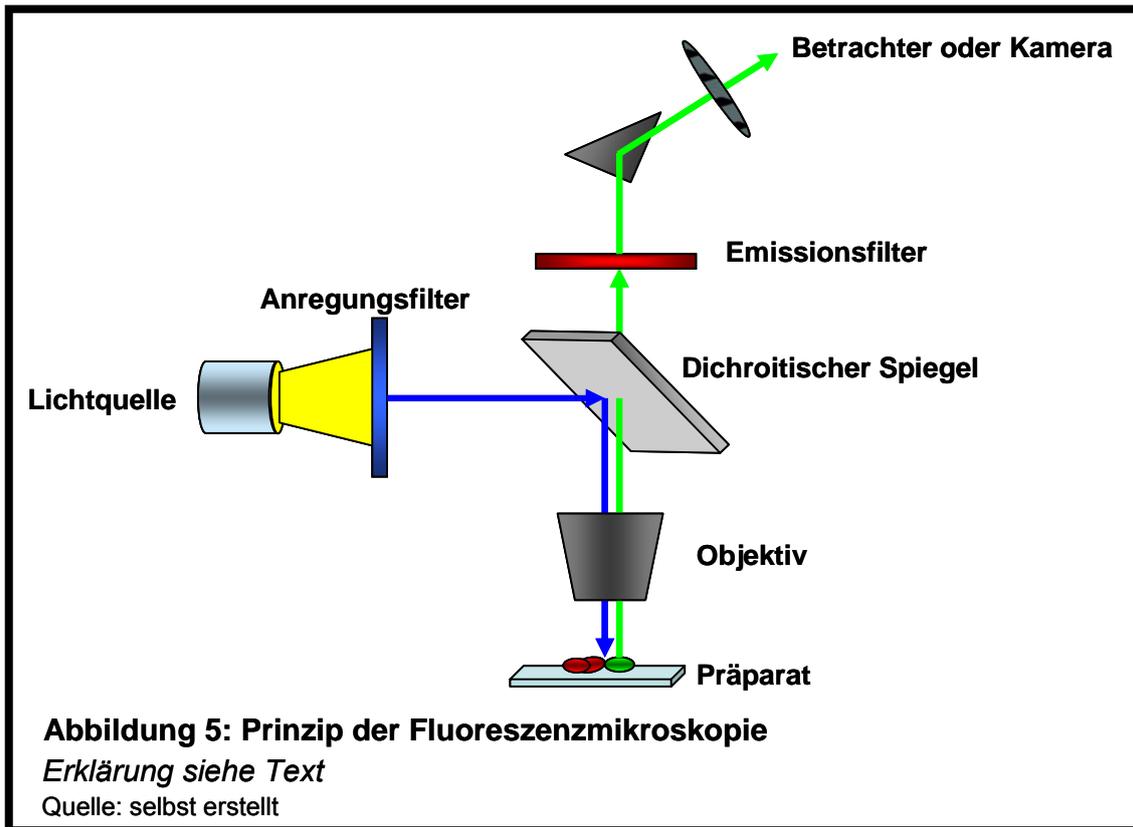
Substanz	Konzentration (mM)
Na-Gluconat	115
NaCl	10
MgATP	1
EGTA	1
HEPES	5

### **2.4.7 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine Kombination der klassischen Lichtmikroskopie mit zusätzlichen Komponenten dar, die es erlaubt, Fluoreszenz direkt an der Zelle zu beobachten. Dazu muss Licht geeigneter Wellenlänge eingestrahlt werden, um die Fluoreszenz anzuregen. Dazu wird ein Anregungsfilter vorgeschaltet. Im Inneren des Mikroskops befindet sich ein Strahlenteiler oder

dichroitischer Spiegel. Dieser hat die Eigenschaft, Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren, langwelligeres Licht kann passieren. Die Grenze wird so gewählt, dass sie zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs liegt. Das emittierte Fluoreszenzlicht, welches langwelliger ist als das eingestrahlte Licht, kann den Spiegel durchdringen. Zusätzlich werden in den Beobachtungsstrahlengang geeignete Filter eingebracht, um die Trennung zu optimieren. Dies ist erforderlich, da das eingestrahlte Licht viel stärker ist als das Fluoreszenzlicht.

Die Erythrozyten wurden für 24 Stunden in Ringer oder chloridfreier Lösung inkubiert. Annexinfärbung fixierte einen Fluoreszenzfarbstoff an den Zellen, die apoptotisch sind. Die Erythrozyten wurden auf mit Polylysin beschichteten Plättchen aufgetragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Mikroskop arbeitet mit 440/480 nm Anregungswellenlänge und 535/550 nm Emissionswellenlänge und einem Q505LP Strahlenteiler (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) in Verbindung mit einem Nikon Mikroskop (Düsseldorf, Deutschland). Die Bilder wurden mit Hilfe eines digitalen Bildgebungssystems (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) und der Metaview-Software dargestellt.



## 2.5 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  den Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die Zahl  $n$  bezieht sich auf die Anzahl von einander unabhängiger Experimente. Die statistische Analyse erfolgte entweder durch ungepaarten t-Test oder ANOVA. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Spontane Phosphatidylexposition

Zuerst sollte geklärt werden, ob es Unterschiede in der unstimulierten spontanen Phosphatidylserin-Exposition nach 24 Stunden bei 37 °C in Ringer gibt. Dabei zeigte sich in beiden Gruppen erwartungsgemäß eine geringe Phosphatidylexposition, was durchflusszytometrisch durch Annexin-V-Fluos-Bindung überprüft wurde. Dennoch gibt es Unterschiede, wobei die fetalen Erythrozyten eine unwesentlich höhere spontane Annexin-Bindung zeigen. Nach einer großen Anzahl ( $n = 20$ ) von Experimenten wurde dieser Unterschied im Prozentsatz Annexin positiver Zellen von adult  $2,10 \pm 0,36$  % gegenüber fetal  $3,85 \pm 1,06$  % statistisch signifikant (Abb. 6).

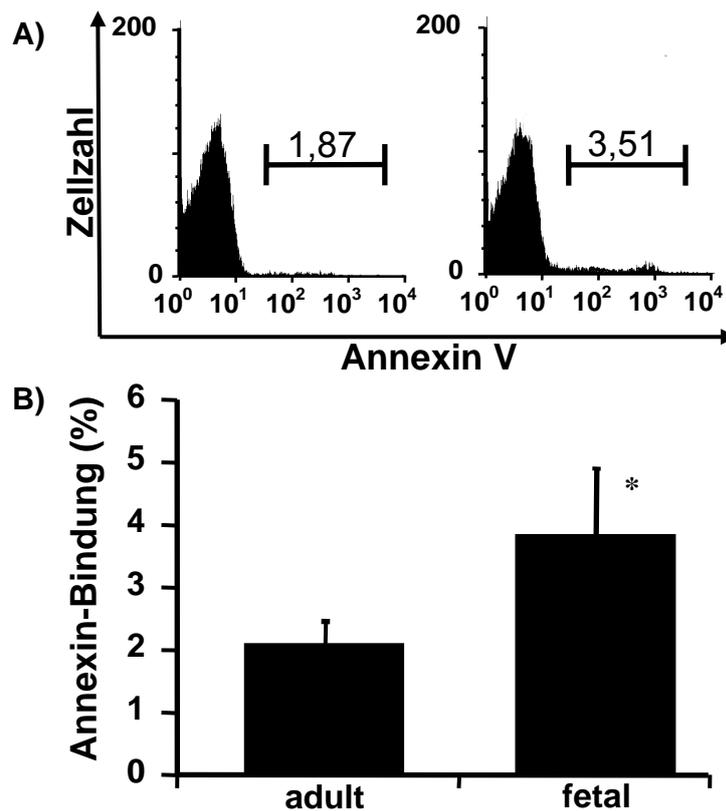


Abbildung 6: Spontane Annexinbindung nach 24 h.

A) Histogramme FITC-Annexin-bindender Zellen in der FACS Analyse eines typischen Experiments mit adulten bzw. fetalen Erythrozyten, die für 24 Stunden in Ringer Lösung bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Annexin-positiver Zellen wieder.

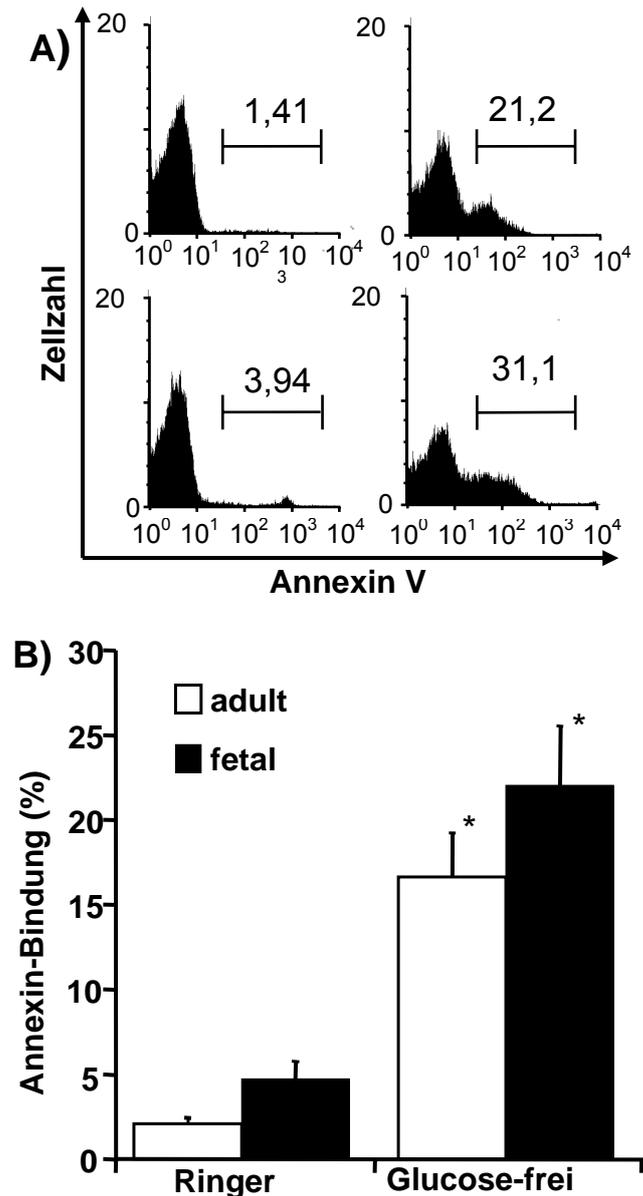
**B) FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von Erythrozyten nach 24 h in Ringer (arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM; n=20). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur adulten Kontrolle (ungepaarter zweiseitiger t-test.  $P \leq 0.05$ ).**

### **3.2 Annexin-Bindung nach verschiedenen Stressoren**

Dieser Vorversuch gibt jedoch allenfalls einen Hinweis auf das Eryptoseverhalten. Anschließend sollte nun der Vergleich der Annexin-Bindung zwischen fetalen und adulten Erythrozyten unter Stress angestellt werden. Dazu kamen verschiedene Stimuli zum Einsatz, die bekanntermaßen *in vitro* Eryptose auslösen. Damit sollte auch geklärt werden, ob fetale Erythrozyten überhaupt Eryptose zeigen und ob Unterschiede im Verhalten gegenüber verschiedenen Stressoren auftreten.

#### **3.2.1 Annexin-Bindung nach Glucose-Depletion**

Eine Möglichkeit, *in vitro* Eryptose auszulösen, stellt die Wegnahme von Glucose aus dem Medium dar. Nach 48 Stunden wurde der Anteil der Annexin-positiven Erythrozyten bei fetalen und adulten Zellen durchflusszytometrisch verglichen. Dabei wurde eine etwas höhere Annexin-Bindung der fetalen Zellen nach Glucose-Depletion nachgewiesen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Abb. 7).



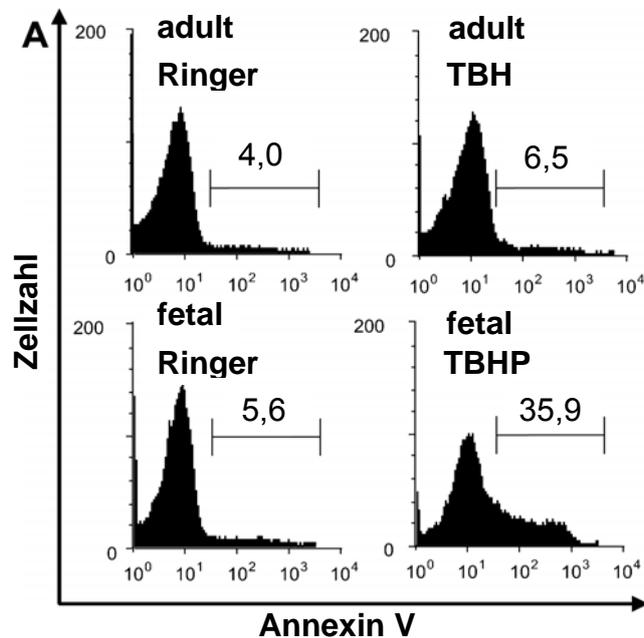
**Abbildung 7: Annexin-Bindung nach Glucose-Depletion.**

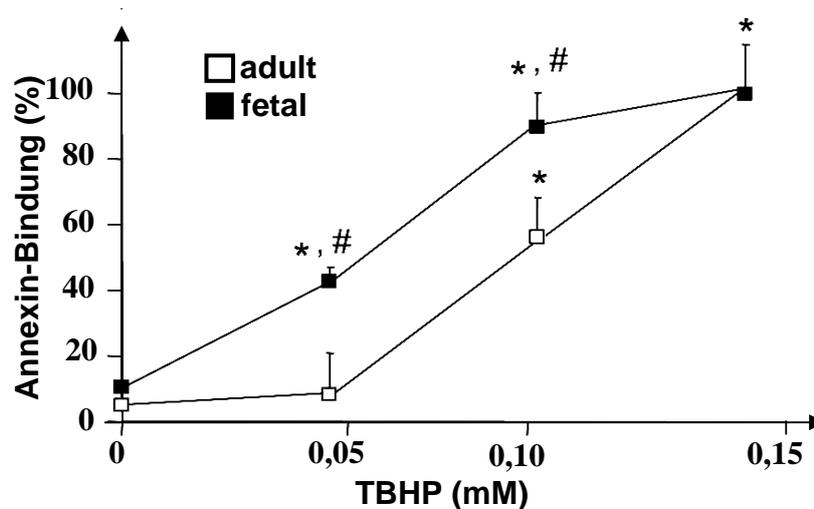
**A).** Histogramme FITC-Annexin-bindender Zellen in der FACS Analyse eines typischen Experimentes mit adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 48 h in Ringer Lösung (links) bzw. glucosefreier Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Annexin-positiver Zellen wieder.

**B)** FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von adulten (weiß) bzw. fetalen (schwarz) Erythrozyten nach 48 h in Ringer (links) bzw. glucosefreier Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Ringer-Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.2.2 Annexin-Bindung durch oxidativen Stress

Glucose-Depletion bewirkt unter anderem eine Erhöhung des oxidativen Stresses durch Gluthation-Verarmung [Mavelli et al., 1984; Bilmen et al., 2001; Lang et al., 2006a]. Um diesen Faktor zu isolieren und näher zu untersuchen, wurden die Erythrozyten verschiedenen Konzentrationen (0-150  $\mu\text{M}$ ) von tert-Butylhydroperoxid ausgesetzt. Dieser Stoff löst oxidativen Stress durch seine Peroxidgruppe aus. Dabei zeigt sich eine deutlich höhere Annexin-Bindung der fetalen Erythrozyten schon bei niedrigen Konzentrationen von TBHP. Erst bei deutlich höheren Konzentrationen um 150  $\mu\text{M}$  gleicht sich der Unterschied wieder an (Abb. 8).





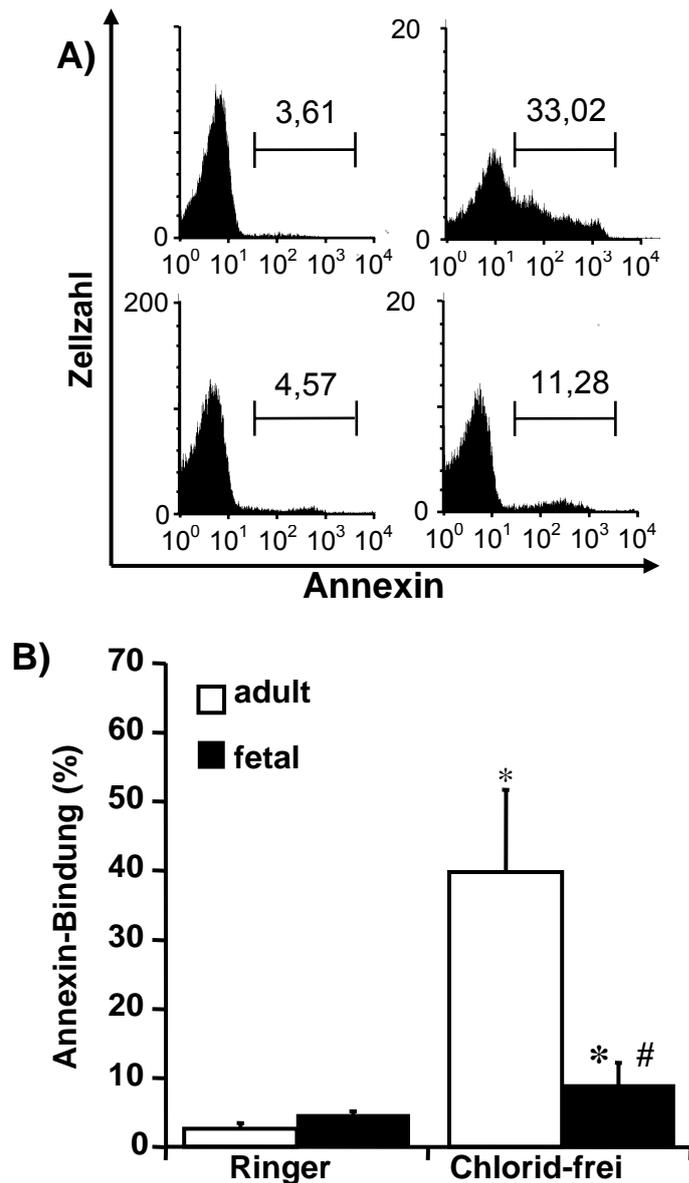
**Abbildung 8: Annexin-Bindung durch tert-Butylhydroperoxid.**

**A** Histogramme FITC-Annexin-bindender Zellen in der FACS Analyse eines typischen Experimentes mit adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 24 h in Ringer (links) bzw. Ringer mit TBHP (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Annexin-positiver Zellen wieder.

**B** FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von adulten (weiß) bzw. fetalen (schwarz) Erythrozyten nach 24 h in 0-0,15 mM tert-Butylhydroperoxid enthaltender Ringerlösung. Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur jew. Ringer-Kontrolle, # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.2.3 Annexin-Bindung durch Chloridwegnahme

Da sich bei oxidativem Stress erhöhte Eryptose-Auslösung bei den fetalen Zellen gezeigt hatte, sollten nun weitere Stimuli der Eryptose untersucht werden. Ein solcher ist die Entfernung von Chlorid aus dem Kulturmedium. Adulte und fetale Erythrozyten wurden für 24 Stunden bei 37 °C in chloridfreier Lösung bzw. bei Ringerlösung zur Kontrolle inkubiert. Durchflusszytometrisch wurde anschließend die Annexin-Bindung bestimmt. Beim Vergleich der Annexin-Bindung nach 24-stündiger Inkubation in chloridfreier Lösung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen, nämlich eine signifikant geringere Annexin-Bindung der fetalen Erythrozyten (Abb. 9).



**Abbildung 9: Annexin-Bindung nach Chloridwegnahme.**

**A)** Histogramme FITC-Annexin-bindender Zellen in der FACS Analyse eines typischen Experimentes mit adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 24 h in Ringerlösung (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Annexin-positiver Zellen wieder.

**B)** FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von adulten (weiße Säulen) bzw. fetalen (schwarze Säulen) Erythrozyten nach 24 h in Ringer (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Ringer-Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.2.4 Annexin-Bindung durch hyperosmolaren Schock

Da sich bislang ein heterogenes Bild gezeigt hatte, sollte nun auch noch ein weiterer *in vitro* üblicher Eryptose-Stimulus getestet werden. Ein solcher ist eine starke Erhöhung der Osmolarität im Kulturmedium. Adulte und fetale Erythrozyten wurden für 24 Stunden bei 37 °C in hyperosmolarer Lösung bei 700 mosm im Vergleich mit normaler Ringerlösung (300 mosm) inkubiert. Anschließend wurde die Annexinbindung durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Annexin-Bindung der fetalen Erythrozyten (Abb. 10).

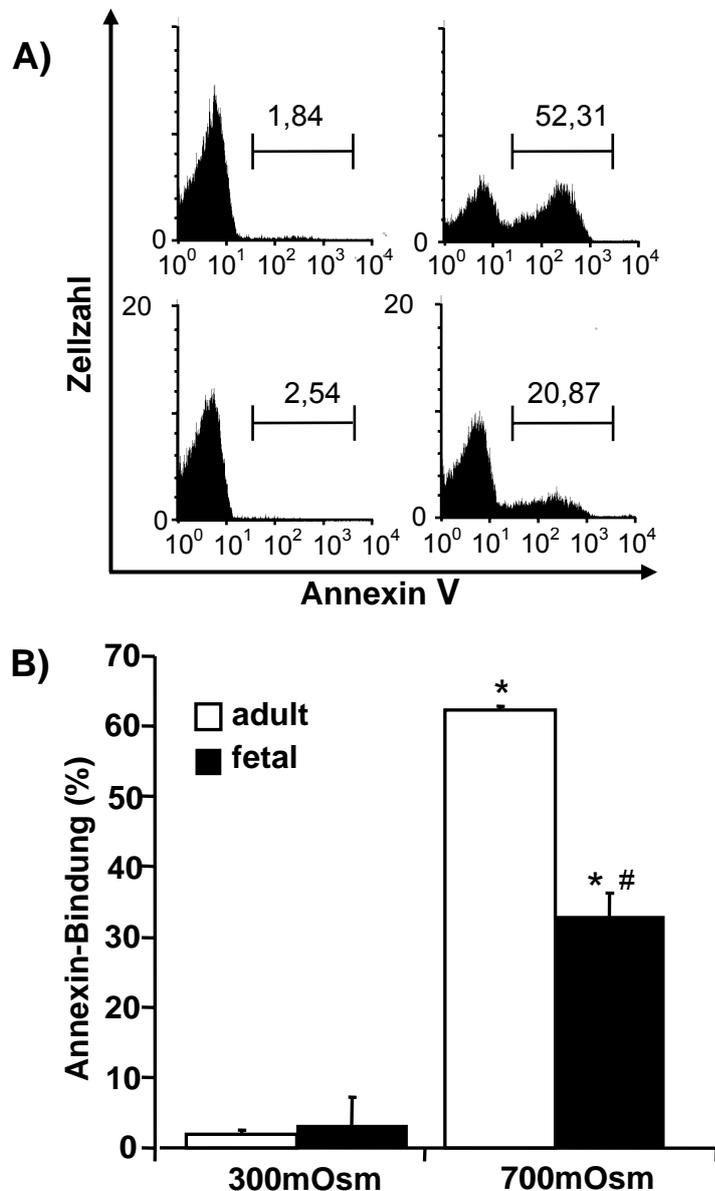


Abbildung 10: Annexin-Bindung nach hyperosmolarem Schock.

**A)** Histogramme FITC-Annexin-bindender Zellen in der FACS Analyse eines typischen Experimentes mit adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 24 h in Ringer Lösung (links) bzw. hyperosmolarer Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil Annexin-positiver Zellen wieder.

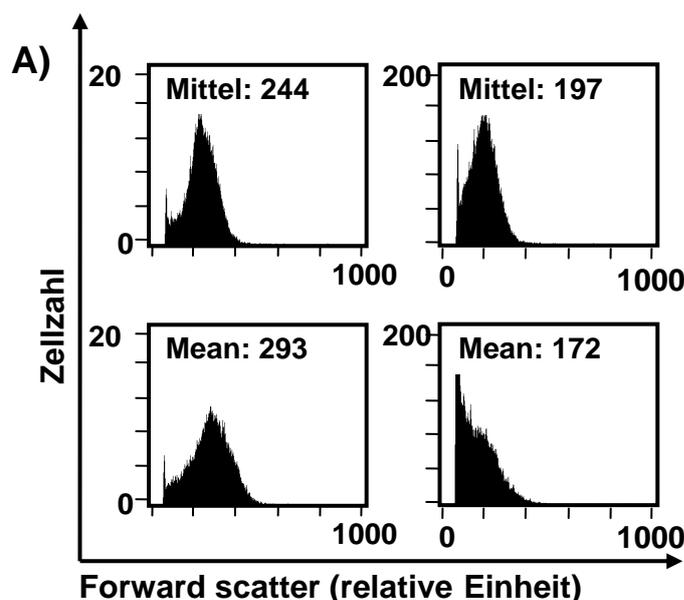
**B)** FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von adulten (weiße Säulen) bzw. fetalen (schwarze Säulen) Erythrozyten nach 24 h in Ringer (links) bzw. hyperosmolarer Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 9$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Ringer-Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

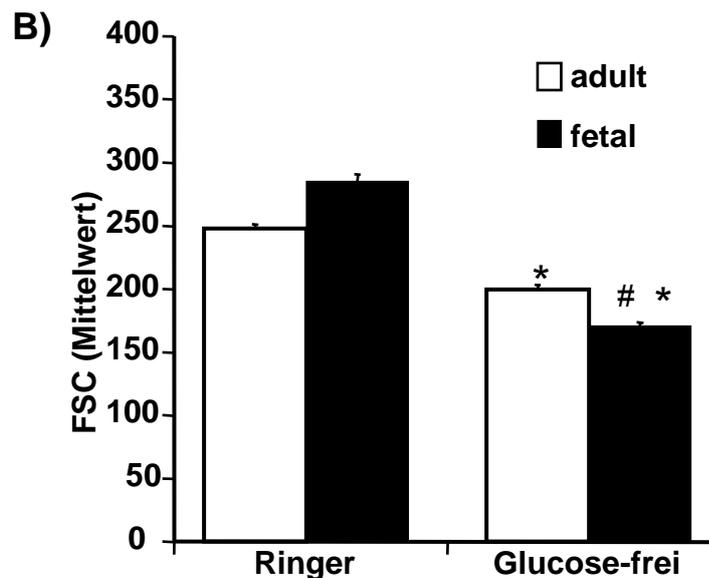
### 3.3 Forward scatter nach verschiedenen Stressoren

Der forward scatter gibt Auskunft über die Zellgröße. Normalerweise schrumpfen die Zellen im Rahmen der Eryptose. Wie zu erwarten waren in allen Gruppen die fetalen Zellen in der Kontrollgruppe etwas größer.

#### 3.3.1 FSC nach Glucose-Depletion

Bei der Betrachtung von Größenveränderungen durch den forward scatter zeigt sich sowohl bei den fetalen Zellen als auch bei adulten Erythrozyten eine signifikante Abnahme der Zellgröße durch die Wegnahme von Glucose für 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe in Ringerlösung. Die Zellschrumpfung ist jedoch bei den fetalen Zellen signifikant stärker, so dass sie in der gestressten Gruppe kleiner sind als die adulten Erythrozyten (Abb. 11).





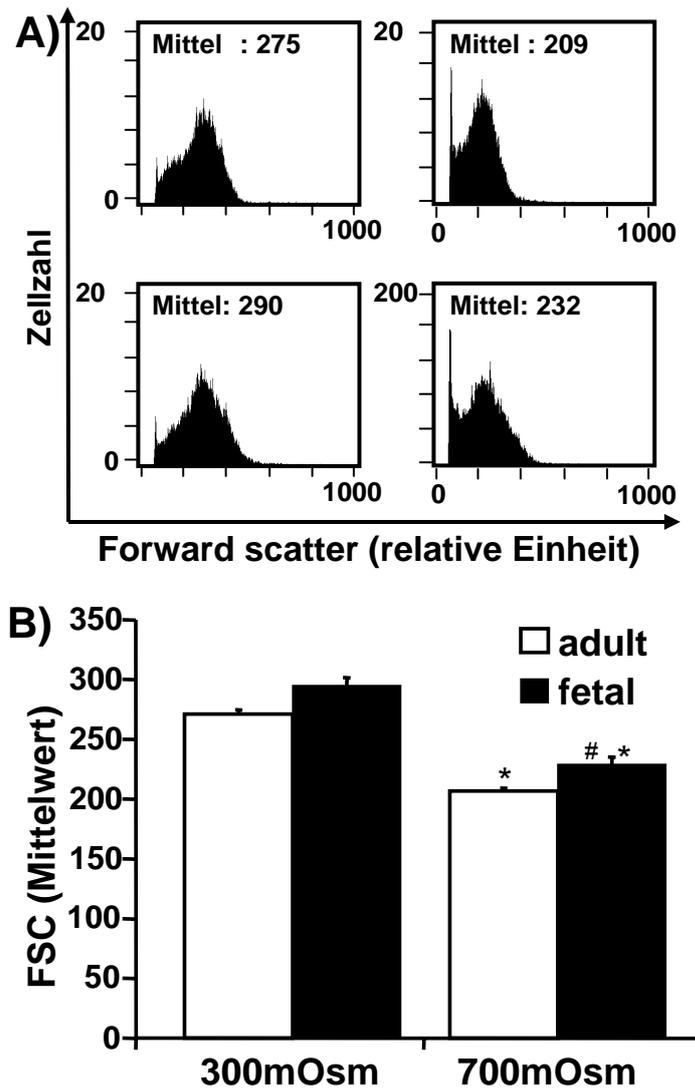
**Abbildung 11: Forward scatter nach Glucose-Depletion.**

**A** Typische FACS Histogramme des forward scatter von adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 48 h in Ringer (links) bzw. glucosefreier Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen beziehen sich auf den Mittelwert im forward scatter.

**B** Mittelwert des forward scatter ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ) in der FACS Analyse von adulten (weiß) bzw. fetalen (schwarz) Erythrozyten nach 48 h in Ringer (links) bzw. glucosefreier Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.3.2 FSC nach hyperosmolarem Schock

Ein anderes Bild zeigt sich beim hyperosmolaren Schock. Hier ist wieder sowohl bei adulten als auch bei fetalen Zellen eine Abnahme des FSC nach Inkubation der Zellen in hyperosmolarer Lösung gegenüber Inkubation in Ringerlösung nachweisbar. Die Abnahme ist jedoch nun bei den fetalen Zellen nicht mehr stärker, sie bleiben auch in hyperosmolarem Medium signifikant größer als die adulten Zellen, was die Verhältnisse der Annexin-Bindung widerspiegelt (Abb. 12).



**Abbildung 12: Forward scatter nach Glucose-Depletion.**

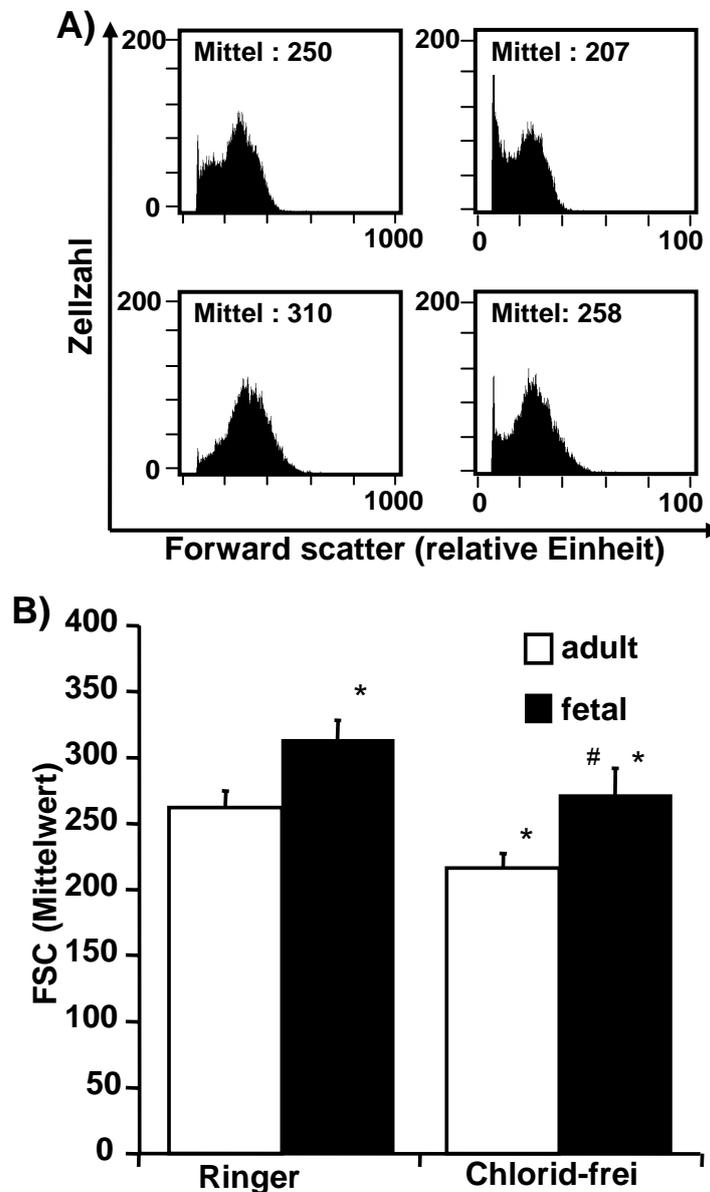
**A)** Typische FACS Histogramme des forward scatter von adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 24 h in Ringer (links) bzw. hyperosmolarer Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen beziehen sich auf den Mittelwert im forward scatter.

**B)** Mittelwert des forward scatter ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ) in der FACS Analyse von adulten (weiße Säulen) bzw. fetalen (schwarze Säulen) Erythrozyten nach 24 h in Ringer (links) bzw. hyperosmolarer Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.3.3 FSC nach Chloridwegnahme

Ähnliches zeigt sich bei Betrachtung der FSC-Daten in chloridfreier Lösung. Wieder bleiben die fetalen Erythrozyten signifikant größer als die adulten Zellen,

wenn sie für 24 Stunden in chloridfreiem Medium inkubiert werden. Gleichwohl schrumpfen sie gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 13).



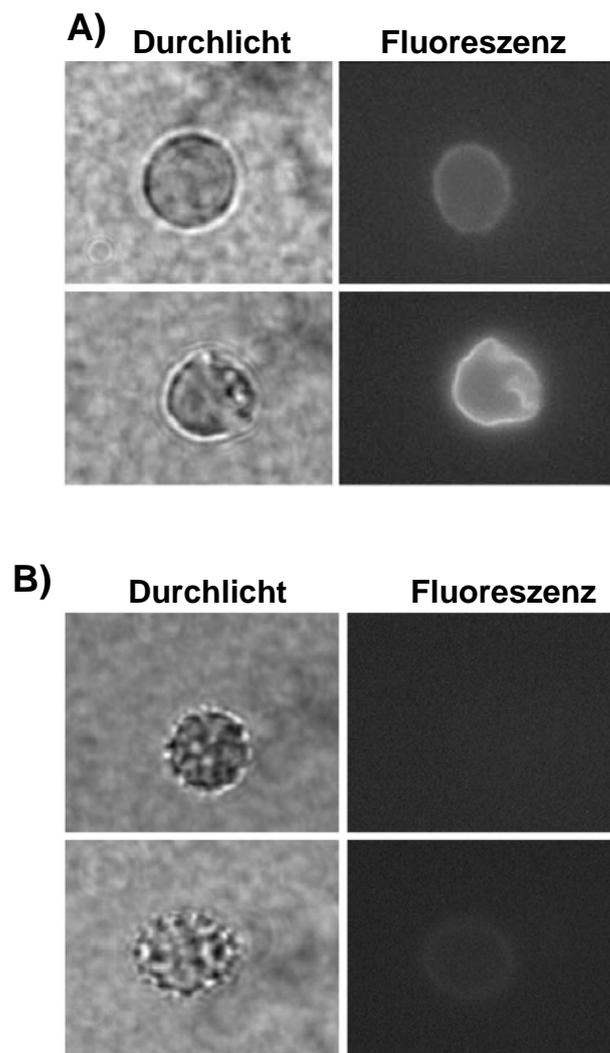
**Abbildung 13: Forward scatter nach Chloridwegnahme.**

**A)** Typische FACS Histogramme des forward scatter von adulten (oben) bzw. fetalen (unten) Erythrozyten, die für 24 h in Ringer (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts) bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zahlen beziehen sich auf den Mittelwert im forward scatter.

**B)** Mittelwert des forward scatter ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ) in der FACS Analyse von adulten (weiß) bzw. fetalen (schwarz) Erythrozyten nach 24 h in Ringer (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.3 Fluoreszenzmikroskopie bei Chloridwegnahme

Um die Ergebnisse der geringeren Annexin-Bindung bei Chloridwegnahme direkt an der Zelle sichtbar zu machen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Dazu wurden fetale bzw. adulte Zellen für 24 Stunden in Ringer bzw. chloridfreier Lösung inkubiert und nach der Färbung im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei bestätigte sich die Erwartung einer schwächeren Fluoreszenz der fetalen Zellen unter dem Stressor der Chloridwegnahme (Abb. 14).



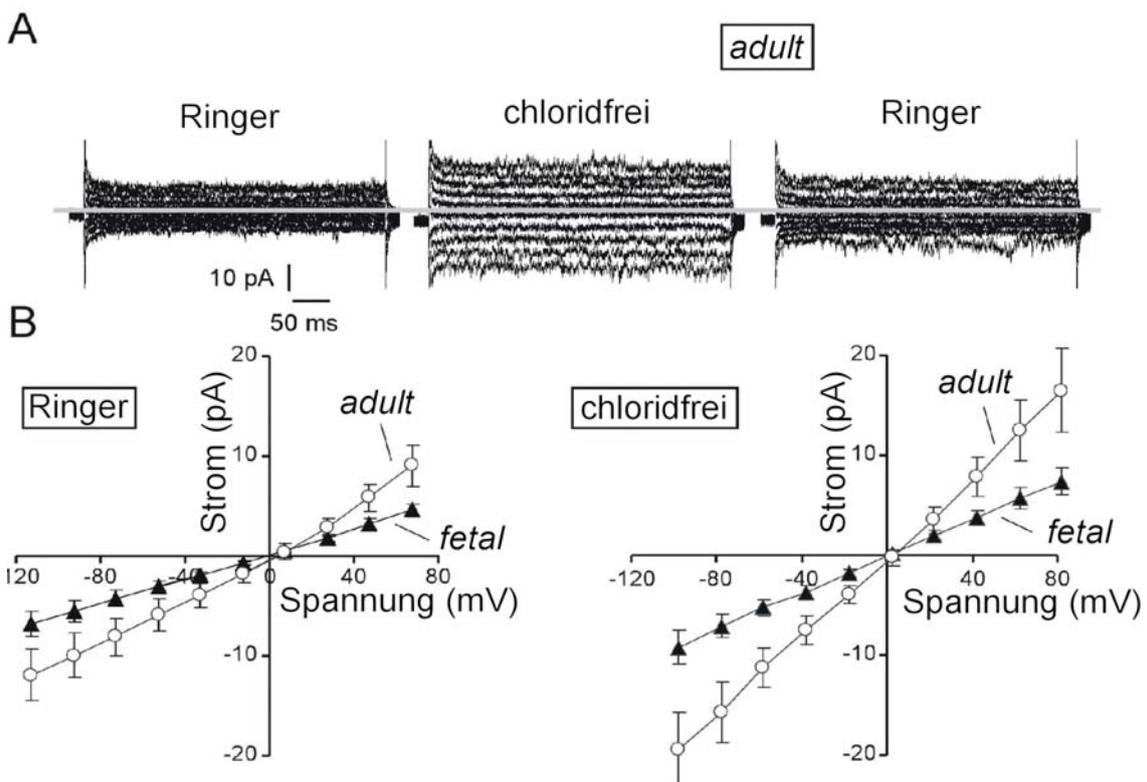
**Abbildung 14: Licht- und Fluoreszenzmikroskopie nach Chloridwegnahme.**

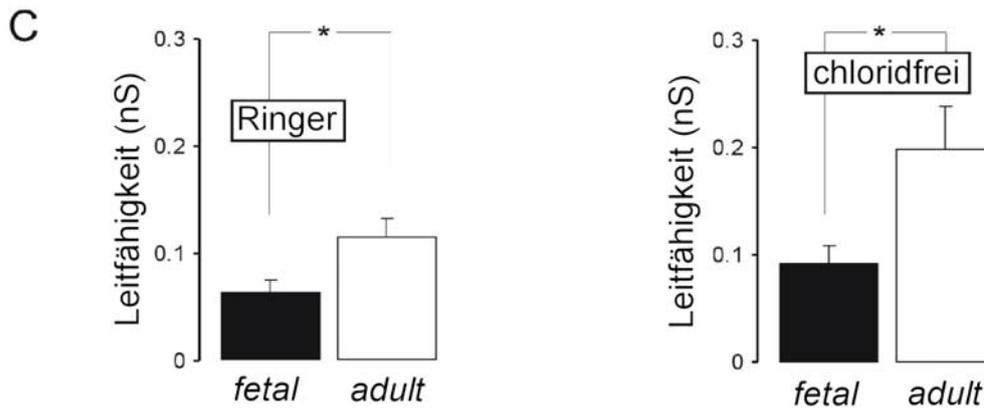
*A) Lichtmikroskopisches Bild (links) zweier adulter Erythrozyten jeweils nach 24 h in Ringer (oben) bzw. chloridfreier Lösung (unten) und das entsprechend dazugehörige fluoreszenzmikroskopische Bild (rechts).*

**B) Lichtmikroskopisches Bild (links) zweier fetaler Erythrozyten jeweils nach 24 h in Ringer (oben) bzw. chloridfreier Lösung (unten) und das entsprechend dazugehörige fluoreszenzmikroskopische Bild (rechts).**

### 3.4 Patch-clamp bei Chloridwegnahme

Um den Mechanismus zu erforschen, der hinter der geringeren Annexin-Bindung der fetalen Zellen bei Chloridwegnahme steht, wurden patch-clamp-Experimente im Ganzzell-Modus durchgeführt. Dies sollte aufklären, ob die Aktivität der unspezifischen Kationenkanäle sich bei fetalen Zellen unterscheidet. Dazu wurden fetale Zellen und adulte Zellen in Ringer bzw. chloridfreier Lösung verglichen. Bei adulten Zellen ist bekannt, dass die Kationenkanäle dadurch aktiviert werden. Dabei zeigten die fetalen Zellen einen signifikant geringeren Einstrom von Kationen unter Chloridwegnahme. Auch die ungestressten Zellen wiesen einen gegenüber adulten Zellen signifikant geringeren einwärts gerichteten Strom von Kationen auf (Abb. 15).





**Abbildung 15: Patch-clamp des chloridsensitiven unselektiven Kationenkanals.**

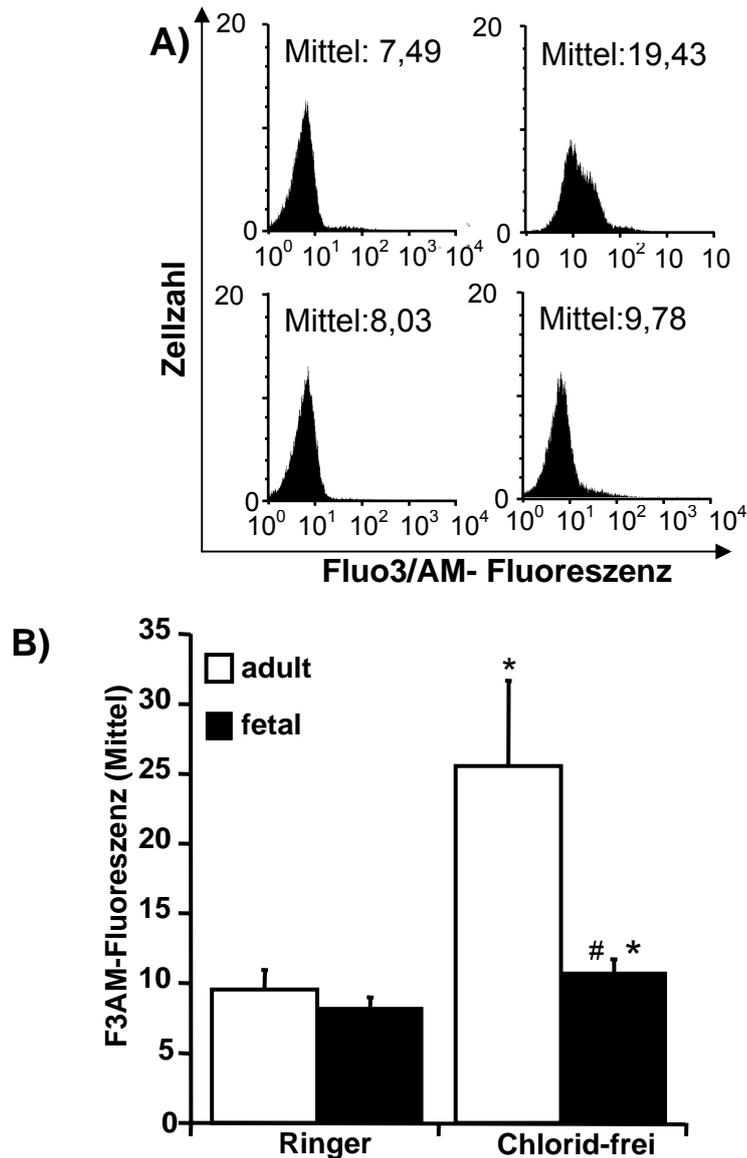
**A)** Originalaufzeichnung von Ganzzellströmen eines adulten Erythrozyten, der aufeinanderfolgend Ringerlösung bzw. chloridfreier Lösung ausgesetzt wurde (Badlösung). Die Pipettenlösung war chloridfrei. Die graue Linie gibt den Nullwert an. Die Membran-Spannung wurde auf 30 mV gehalten.

**B)** Mittlere Strom-Spannungs-Beziehung ( $\pm$  SEM;  $n = 5$  jeweils) aufgezeichnet mit chloridfreier Pipettenlösung und Ringer (links) bzw. chloridfreier Badlösung (rechts) für adulte (Kreise) und fetale Erythrozyten (Dreiecke).

**C)** Mittlere Leitfähigkeit im Ganzzellmodus ( $\pm$  SEM;  $n = 5$  jeweils) bei Ringer (links) und chloridfreier Badlösung (rechts) für adulte (weiß) und fetale (schwarz) Zellen, die durch lineare Regression der Daten in Abschnitt B errechnet wurde. \* bedeutet signifikanter Unterschied zwischen fetalen und adulten Erythrozyten (ungepaarter zweiseitiger t-test.  $P \leq 0.05$ ).

### 3.5 Intrazelluläre Calcium-Messung

Die Messungen im patch-clamp hatten also eine höhere Aktivität der unspezifischen Kationenkanäle bei den adulten Zellen ergeben. Um festzustellen, ob ein geringerer Calcium-Einstrom in die fetalen Erythrozyten durch Chloridwegnahme erfolgt, wurde intrazelluläres Calcium mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach sechsständiger Inkubation in Ringer bzw. chloridfreier Lösung zeigte sich stimuliert eine signifikant geringere intrazelluläre Calcium-Aktivität in den fetalen Zellen (Abb. 16).



**Abbildung 16: intrazelluläre Calcium-Messung.**

**A** Typische FACS-Histogramme Fluo3-abhängiger Fluoreszenz in adulten (oben) oder fetalen (unten) Erythrocyten, die für 6 h in Ringer (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts) inkubiert wurden. Die Zahlen geben den Mittelwert der jeweiligen Erythrozytenpopulation an.

**B.** Fluoreszenzaktivität nach Fluo-3/AM-Färbung adulter (weiß) oder fetaler (schwarz) Erythrozyten nach 6 h in Ringer (links) bzw. chloridfreier Lösung (rechts). Zum Vergleich, die Positivkontrolle durch Ionomycin erhöht die mittlere Fluoreszenz der Erythrozyten auf  $75 \pm 8$  ( $n = 6$ , Daten nicht im Bild). Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 5$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0.05$ ).

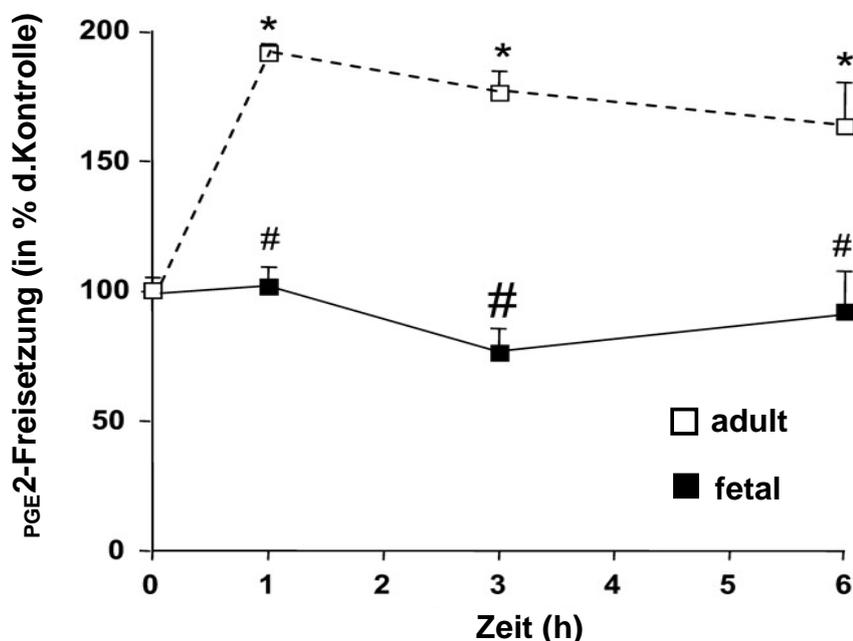
### 3.6 PGE<sub>2</sub>-Wirkung

Die Entfernung von Chlorid aus dem Medium löst bei adulten Erythrozyten eine PGE<sub>2</sub>-Freisetzung aus, die für die Kationenkanalaktivierung zumindest mitverantwortlich ist.

Um nun festzustellen, ob eine verminderte PGE<sub>2</sub>-Bildung bzw. PGE<sub>2</sub>-Sensitivität zu der geringeren Kationenkanalaktivität im Patch-clamp beiträgt, wurden entsprechende Untersuchungen angestellt.

#### 3.6.1 PGE<sub>2</sub>- Freisetzung durch Chloridwegnahme

Durch einen Enzym-Immuno-Assay wurde die PGE<sub>2</sub>-Menge bestimmt, die adulte bzw. fetale Erythrozyten nach verschiedenen Zeiten in chloridfreier Lösung in das Medium freigesetzt hatten. Dieser Wert wurde dann in Bezug zur Kontrolle gesetzt. Die fetalen Erythrozyten produzierten dabei in signifikanter Weise weniger PGE<sub>2</sub>. Bereits das Kontroll-Niveau der fetalen Zellen liegt etwas niedriger. Im Überstand der gestressten fetalen Erythrozyten verharrten die PGE<sub>2</sub>-Level ungefähr auf Kontroll-Niveau, während sich die Level im Überstand der gestressten adulten Zellen ungefähr verdoppelten (Abb. 17).



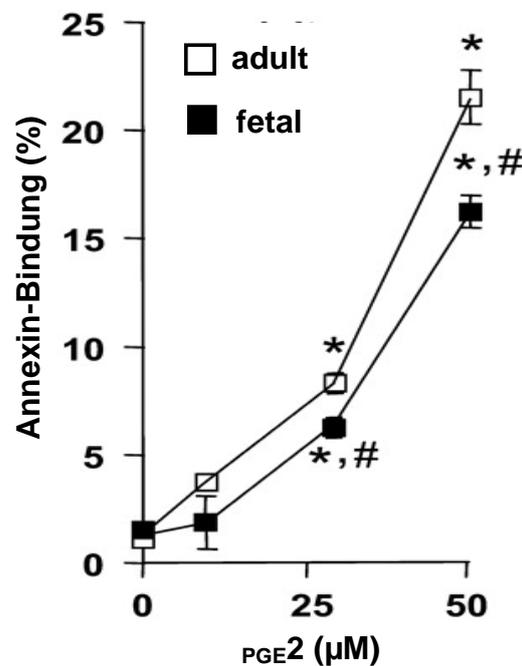
**Abbildung 17: PGE<sub>2</sub>-Freisetzung nach Chloridwegnahme.**

Arithmetisches Mittel ( $\pm$  SEM,  $n = 3$ ) der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand (in % der Kontrolle) adulter (weiß, Kontrolle:  $85 \pm 2$  pg/mL) und fetaler (schwarz, Kontrolle:  $77 \pm 4$  pg/mL) Erythrozyten nach Chloridwegnahme. \* bedeutet

signifikanter Unterschied zur adulten Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0.05$ .) # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Erythrozyten (ANOVA  $P \leq 0,05$ ).

### 3.6.2 Annexin-Bindung durch PGE<sub>2</sub>

Um nun herauszufinden, ob es auch Unterschiede in der Sensitivität gegenüber PGE<sub>2</sub> zwischen adulten und fetalen Zellen gibt, wurden beide Gruppen in Ringer bzw. unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> im Medium für 24 Stunden inkubiert. Dabei zeigte sich wiederum eine signifikant geringere Annexin-Bindung der fetalen Zellen im Vergleich zur adulten Kontrolle (Abb.18).

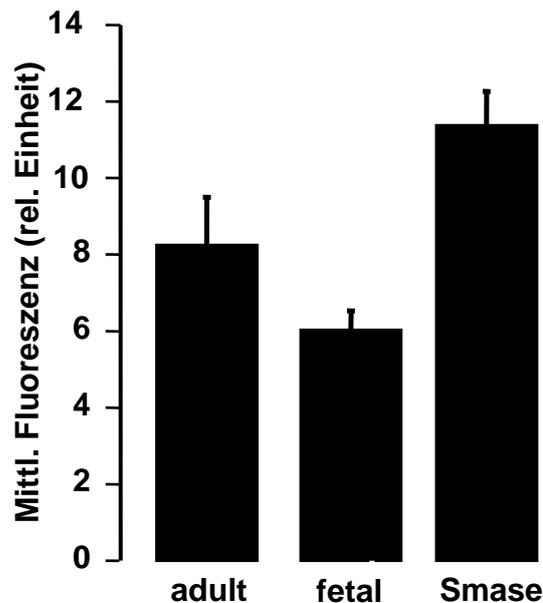


**Abbildung 18: Annexin-Bindung nach PGE<sub>2</sub>-Exposition.**

FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS-Analyse von adulten (weiße Säulen) bzw. fetalen (schwarze Säulen) Erythrozyten nach 24 h in Ringer mit unterschiedlichen Konzentrationen von PGE<sub>2</sub>. Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Ringer-Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0,05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0,05$ ).

### 3.7 Spontane Ceramid-Freisetzung

Um eine mögliche Involvierung der Ceramid-Bildung zu überprüfen, wurden durchflusszytometrische Messungen des Ceramids an unstimulierten fetalen und adulten Zellen vorgenommen. Dabei zeigte sich eine geringere Ceramid-Bildung der fetalen Zellen, die jedoch nicht signifikant war (Abb. 19).

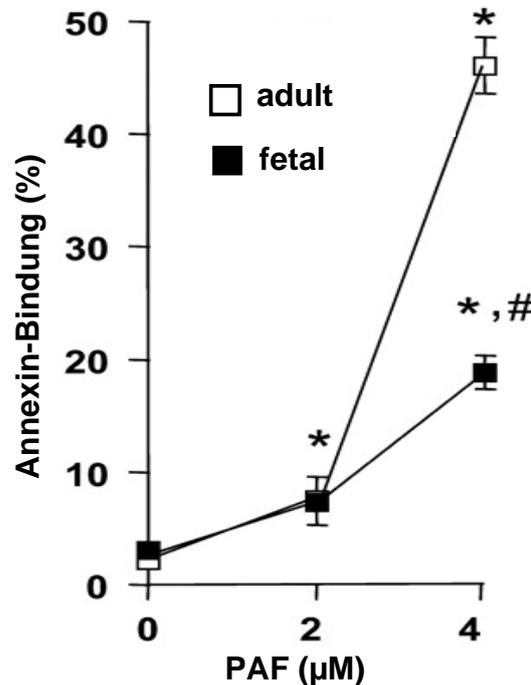


**Abbildung 19: Ceramid-Bestimmung.**

*Mittlere Fluoreszenzintensität (willkürliche Einheit) von Erythrozyten in der FACS-Analyse nach Färbung mit Anti-Ceramid-Antikörper und FITC-gekoppeltem Anti-Mauskörper (in willkürlichen Einheiten) in der FACS Analyse nach 24 h in Ringer (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 5).*

### 3.8 Annexin-Bindung durch PAF

Der Ceramid-Signalweg wird durch PAF aktiviert. Um die Eryptose-Empfindlichkeit der fetalen Erythrozyten nach PAF-Exposition im Vergleich mit adulten Zellen zu überprüfen, wurden die jeweiligen Erythrozyten für 24 Stunden bei verschiedenen Konzentrationen von PAF im Medium inkubiert und danach durchflusszytometrisch die Annexin-Bindung gemessen. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl Annexin-positiver fetaler Zellen im Vergleich zu den adulten Erythrozyten (Abb. 20).



**Abbildung 20: Annexin-Bindung.**

*FITC-Annexin-bindende Zellen in % der Gesamtzellpopulation in der FACS Analyse von adulten (weiß) bzw. fetalen (schwarz) Erythrozyten nach 24 h in Ringer mit unterschiedlichen Konzentrationen von PAF. Angegeben ist das arithmetische Mittel ( $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). \* bedeutet signifikanter Unterschied zur Ringer-Kontrolle (ANOVA.  $P \leq 0,05$ ), # bedeutet signifikanter Unterschied gegenüber adulten Zellen (ANOVA.  $P \leq 0,05$ ).*

### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Fetale Erythrozyten zeigen wie adulte Zellen Annexin-Bindung als Zeichen der Eryptose nach verschiedenen Stressoren. Während sie einen signifikant höheren Prozentsatz Annexin-positiver Zellen im unstimulierten Ansatz sowie nach Glucose-Depletion und insbesondere oxidativem Stress aufweisen, scheinen sie andererseits unempfindlicher gegenüber hyperosmolarem Schock und Chloridwegnahme aus dem Medium. Unstimuliert und nach Chloridwegnahme findet sich eine signifikant geringere Leitfähigkeit unspezifischer Kationenkanäle. Daraus resultiert auch ein signifikant geringerer Einstrom von Calcium in chloridfreier Lösung. Die Produktion von  $\text{PGE}_2$  sowie die Empfindlichkeit gegenüber  $\text{PGE}_2$  sind bei fetalen Zellen gegenüber adulten Zellen signifikant herabgesetzt. Unstimulierte Ceramid-Bildung ist bei fetalen Zellen schwächer.

## Ergebnisse

---

Schließlich ist die Empfindlichkeit gegenüber PAF bei fetalen Zellen im Vergleich signifikant geringer.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion

Alle verwendeten Methoden sind valide und gut etabliert. Sie werden seit längerer Zeit zur Erforschung des programmierten Zelltods bei Erythrozyten eingesetzt. Signifikante Unterschiede lassen Rückschlüsse auf das Eryptose-Verhalten der untersuchten Zellen zu.

Bei der Ceramid-Messung traten vorübergehend Probleme mit den Antikörpern auf, da bei Messungen mit bestimmten Chargen eine Reaktion weder bei der Positivkontrolle (Sphingomyelinase) noch bei anderen Messwerten zu sehen war. Dies lässt darauf schließen, dass der Antikörper nicht genügend bindet. Diese Daten wurden nicht berücksichtigt.

Eine übliche Kontrolle der Annexin-Versuche ist die Gegenfärbung der Zellen mit Propidium-Iodid. Sie dient dazu, den positiven Nachweis nekrotischer Zellen zu überprüfen. Bei Erythrozyten ist sie allerdings nicht möglich, da Propidium-Iodid in nekrotischen Zellen DNA anfärbt, welche in Erythrozyten nicht vorhanden ist. Die Nekrose des Erythrozyten ist gewissermaßen die Hämolyse. Um Hämolyse auszuschließen, wurde bei ausgewählten Experimenten das freie Hämoglobin im Überstand bestimmt. Dabei zeigte sich keine relevante Hämolyse.

Die untersuchte fetale Erythrozytenpopulation wurde aus Nabelschnurblut gewonnen. Dieses enthält auch größere Mengen an Leukozyten und anderen Blutzellen [Coulombel et al., 1979]. Sie machen jedoch zahlenmäßig nur einen so unerheblichen Anteil an der untersuchten Gesamtpopulation aus, dass nicht davon auszugehen ist, dass die Leukozyten das Ergebnis in nennenswerter Weise verfälschen könnten. Dennoch wurden bei den adulten Kontrollen frisch gewonnene, unbehandelte Vollblut-Proben eingesetzt, um eine größtmögliche Ähnlichkeit der Populationen zu gewährleisten.

Nabelschnurblut stellt eine Mischung fetaler und adulter Zellen dar, wobei die HbF enthaltenden Zellen in der Mehrheit sind [Bard, 1973]. Die Bezeichnung „fetal“ ist daher nur eingeschränkt zutreffend. Gemessene Unterschiede

zwischen den Gruppen sollten durch diese Tatsache jedoch eher gemindert werden, was also die Aussagekraft der Ergebnisse nicht einschränkt. Es ist eher anzunehmen, dass bei homogenen Populationen noch größere Unterschiede nachweisbar wären.

## **4.2 Ergebnisdiskussion**

Erythrozyten zeigen mit der Eryptose eine besondere Form des programmierten Zelltods, die vor allem charakterisiert ist durch Phosphatidylserin-Exposition und Zellschrumpfung [Lang et al., 2006a]. Die Phosphatidylserin-Exposition kann durch Annexin-Bindung nachgewiesen werden [Andree et al., 1990; Vermes et al., 1995]. Durch Phosphatidylserin-Exposition wird die rasche Entfernung geschädigter Erythrozyten aus der Blutbahn sichergestellt [Schroit et al., 1985; Fadok et al., 1992; Messmer und Pfeilschifter, 2000]. Vermittelt wird die Eryptose insbesondere durch Calcium-Einstrom durch unselektiven Kationenkanälen [Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001; Lang et al., 2003a; Lang et al., 2003b]. Weiterhin kann die für die Phosphatidylserin-Exposition verantwortliche Scramblase durch Ceramid-Bildung für intrazelluläres Calcium sensitiviert werden [Lang et al., 2004a].

### **4.2.1 Spontane Annexinbindung**

Inkubation in Ringer für 24 Stunden bei 37 °C stellt die ungestresste Kontrollsituation für den Großteil der Experimente dar. Hier zeigen sich kleine Unterschiede in der spontanen Phosphatidylserin-Exposition und somit nachfolgende Annexin-Bindung zwischen fetalen und adulten Erythrozyten. Dies deutet auf eine etwas größere spontane Eryptose-Neigung der fetalen Erythrozyten unter den Versuchsbedingungen *in vitro* hin – allerdings nicht in einem Ausmaß, das Schlüsse auf die Eryptose bei fetalen Erythrozyten generell zuließe. Die Unterschiede sind so klein, dass man davon ausgehen kann, dass das Kontrollniveau fetaler und adulter Erythrozyten vergleichbar ist. Unterschiede in gestressten Situationen sollte man also ebenfalls aufeinander beziehen können. Dass die fetalen Erythrozyten, welche eine kürzere Lebensdauer aufweisen und

in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum aus dem Blut des Säuglings verschwinden [Matoth et al., 1971], eine etwas größere spontane Phosphatidylserin-Exposition zeigen [Jain, 1986], überrascht wenig. Allerdings muss man einwenden, dass dieser recht geringe Unterschied auch auf nie ganz zu vermeidende Abweichungen in der Probengewinnung bzw. Lagerung zurückzuführen sein könnte.

### 4.2.2 Annexin-Bindung gestresster Zellen

Die Betrachtung der spontanen Annexin-Bindung liefert noch keinen eindeutigen Hinweis auf die Eryptose-Fähigkeit fetaler Erythrozyten. Diese Frage lässt sich durch die Betrachtung verschiedener Stressoren, die *in vitro* Eryptose auslösen, beantworten. Eine Möglichkeit stellt die Inkubation in glucosefreiem Medium dar. Dabei wirken mehrere Mechanismen zusammen. Zum einen wird durch Schwächung der anti-oxidativen Abwehr des Erythrozyten oxidativer Stress ausgelöst [Mavelli et al., 1984; Bilmen et al., 2001], zum anderen stellt der Energiemangel an sich einen Eryptose-Stimulus dar. Dabei wird auch über die Proteinkinase C ein Calcium-Einstrom ausgelöst [Andrews et al., 2002; Klarl et al., 2006], der zur Eryptose führt. Setzt man fetale Zellen diesem Stressor aus, so zeigen sie stärkere Annexin-Bindung als die adulten Zellen. Dies deutet in überzeugender Weise darauf hin, dass fetale Zellen ebenso wie adulte Erythrozyten auf bestimmte Stimuli mit Eryptose reagieren. Allerdings ist der Unterschied zu den adulten Zellen nicht signifikant. Eine Erklärung dafür könnte die Aktivierung der verschiedenen Signalwege beim Erythrozyten durch Glucose-Depletion liefern. Die Unterschiede beziehen sich möglicherweise nur auf einen Faktor und nicht auf alle, so dass sich mehrere Faktoren überlagern. Zudem ist der Glucoseverbrauch fetaler Zellen etwas niedriger, was die Wirkung dieses Stressors mindert [Oski, 1969].

Der Faktor des oxidativen Stresses lässt sich durch die Zugabe von tert-Butylhydroperoxid auch isoliert untersuchen. Dieser Stoff enthält eine aggressive Peroxid-Gruppe und ist zugleich stabil genug, um für die Versuche Verwendung zu finden. Durch oxidativen Stress werden die unselektiven Kationenkanäle

geöffnet, was einen Calcium-Einstrom nach sich zieht [Duranton et al., 2002]. Und hier zeigt sich nun ein sehr eindeutiger Unterschied in der Annexin-Bindung. Fetale Zellen weisen bereits bei moderaten Konzentrationen von TBHP signifikant höhere Annexin-Bindung auf, die sich bei hohen Konzentrationen angleicht. Es ist bekannt, dass fetale Erythrozyten empfindlicher sind gegenüber oxidativem Stress als adulte Zellen [Jain, 1989; Shahal et al., 1991]. Die vorliegenden Ergebnisse scheinen eine Erklärung für diese Beobachtung zu liefern. Die anti-oxidativen Reserven in Form von Glutathion oder Vitamin E sind bei fetalen Zellen geringer [Jain, 1986; Jain et al., 1996; Rajmakers et al., 2003]. Dies trifft umso mehr für Frühgeborene zu [Guajardo et al., 1995; Buhimschi et al., 2003], die auch eine stärkere Anämie-Neigung zeigen. Wodurch genau die höhere Annexinbindung fetaler Zellen zu Stande kommt, wurde nicht untersucht. Es ist jedoch anzunehmen, dass der oxidative Stress zu einer stärkeren Öffnung der unselektiven Kationenkanäle führt. Bei oxidativem Stress vollzieht sich der Calcium-Einstrom unabhängig von PGE<sub>2</sub>-Bildung vermutlich durch Abbau der Calcium-ATPase [Damonte et al., 1992] und direkte Aktivierung der unselektiven Kationenkanäle [Duranton et al., 2002]. Dies geschieht über einen unbekanntem Mechanismus, möglicherweise durch direkte Veränderung von Kanalproteinen wie bereits für andere Kanäle demonstriert [Wagner et al., 2000]. Weiterhin sorgt er für eine Caspasen-Aktivierung, die die Bande 3 abbaut [Mandal et al., 2002; Mandal et al., 2003]. Hier wird ein detaillierteres Verständnis der Eryptose durch oxidativen Stress in Zukunft hier zusätzliche Erkenntnisse auch für die involvierten Faktoren bei den fetalen Zellen ermöglichen.

Ein weiterer Eryptose-Stimulus ist die Wegnahme von Chlorid, da hierdurch ebenfalls der unselektive Kationenkanal aktiviert wird [Huber et al., 2001]. Dies geschieht zumindest teilweise durch die Bildung von PGE<sub>2</sub> [Lang et al., 2005c]. Bei diesem Stimulus reagieren die fetalen Zellen mit signifikant geringerer Annexin-Bindung. Eine Änderung gegenüber dem Kontroll-Niveau ist nicht signifikant erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass sie auf diesen Stimulus deutlich weniger mit Eryptose reagieren. Es erschien somit wahrscheinlich, dass dieser relativ gut untersuchte Signalweg bei fetalen Erythrozyten in weit

geringerem Maße aktiviert wird. Dazu wurden weitere Untersuchungen angestellt (s. unten).

Schließlich wurden die fetalen Zellen in ihrer Reaktion auf hyperosmolaren Schock mit adulten Zellen verglichen. Dieser aktiviert wie gezeigt nicht nur den unspezifischen Kationenkanal, sondern auch die Sphingomyelinase [Lang et al., 2004a]. Zumindest teilweise geschieht dies durch die Freisetzung von PAF [Lang et al., 2005d]. Auch aus diesem Grund ist die Untersuchung dieses Stressors von Interesse. Fetale Erythrozyten zeigten dabei signifikant geringere Annexin-Bindung. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass fetale Erythrozyten über eine höhere osmotische Resistenz verfügen [Danon et al., 1970; Serrani et al., 1989; Bautista et al., 2003]. Dies könnte also auch mit einer geringeren Neigung zur Eryptose zusammenhängen. Eine mögliche Rolle der Proteinkinase C wurde nicht untersucht. Ob geringere PAF-Bildung und Ceramid-Freisetzung eine Rolle spielen, sollten weitere Experimente zeigen. Für verschiedene Stimuli werden also teilweise höhere, teilweise niedrigere Eryptose-Raten gefunden. Die Eryptose kommt folglich auch in fetalen Zellen vor und wird dort auf eine Weise reguliert, die sich von den Erythrozyten des Erwachsenen unterscheidet.

### **4.2.3 Betrachtung der Zellgröße über den forward scatter**

Zellschrumpfung ist ein typisches Merkmal des programmierten Zelltods – auch bei Erythrozyten [Lang et al., 1999; Lang et al., 2006c]. Sie wird ausgelöst durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Kalium-Kanälen, die zum Ausstrom von Kalium-Ionen und im Gefolge davon auch Chlorid und Wasser führen [Bookchin et al., 1987; Hoffman et al., 2003; Lang et al., 2003d]. Die Größenänderung der Zellen lässt sich durch Analyse des forward scatters beobachten. Fetale Zellen sind in den Kontrollen durchweg etwas größer als die adulten Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Beobachtungen [Alter et al., 1988; Colin et al., 1992]. Nach Glucose-Depletion weisen fetale Erythrozyten eine höhere Annexin-Bindung auf. Dies spiegelt sich auch im forward scatter wieder, da die fetalen Zellen unter dem Stressor sogar kleiner werden als die adulten Zellen. Das

typische Eryptose-Merkmal der Zellschrumpfung findet sich also auch bei den fetalen Erythrozyten, was die Erkenntnis untermauert, dass fetale Erythrozyten Eryptose zeigen.

Bei hyperosmolarem Schock weisen die fetalen Erythrozyten geringere Annexin-Bindung auf als die adulten Zellen. Sie schrumpfen nun nicht mehr stärker, sondern halten den Abstand gegenüber den adulten Zellen ungefähr. Sie werden also osmotisch etwas kleiner, aber die Eryptose-bedingte Schrumpfung über den Gardos-Kanal fällt vermutlich weg. Ähnliches gilt für die Beobachtung bei Chloridwegnahme. Annexin-Bindung und Zellschrumpfung korrelieren auch hier, was die Erwartungen bestätigt. Allerdings sollte man annehmen, dass die fetalen Zellen relativ gesehen weniger stark schrumpfen als die adulten Zellen, anstatt die Größenverhältnisse beizubehalten. Die fetalen Zellen zeigen jedoch sowohl in hyperosmalerer wie in chloridfreier Lösung eine etwa höhere Eryptose als das Kontroll-Niveau, was die leichte Schrumpfung erklären könnte. Möglicherweise haben die Unterschiede in den Mechanismen bei fetalen Zellen einen größeren Einfluss auf die Annexin-Bindung als auf die Zellschrumpfung, was die geringfügig weniger enge Korrelation erklären könnte. Dennoch bleibt im Ganzen festzuhalten, dass die Größenbeobachtungen die Erkenntnisse der Annexin-Bindung bekräftigen.

#### **4.2.4 PGE<sub>2</sub> und Calcium-Signalweg bei Chloridwegnahme**

Die Bilder der Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass auf der Membranoberfläche weniger Annexin-FITC gebunden wird. Man kann also annehmen, dass der Unterschied wirklich durch eine geringere Phosphatidylserin-Exposition auf der Zelloberfläche zu Stande kommt und Annexin nicht in nekrotische Trümmer diffundiert ist [Koopman et al., 1994].

Adulte Zellen reagieren auf Entfernung von Chlorid aus dem Medium oder der Zellschrumpfung bei hyperosmolarem Schock mit der Produktion von PGE<sub>2</sub> [Lang et al., 2005c]. Vermutlich geschieht dies wie in anderen Zellen vermittelt durch die Aktivierung von MAP-Kinasen [Yang et al., 2000]. Entsprechend den Ergebnissen der Annexin-Bindung konnte nachgewiesen werden, dass der

Überstand von in chloridfreier Lösung inkubierten fetalen Erythrozyten signifikant weniger PGE<sub>2</sub> als der Überstand adulter Zellen enthält. Daraus lässt sich schließen, dass fetale Erythrozyten signifikant weniger stark als adulte Zellen mit PGE<sub>2</sub>-Bildung auf Chloridwegnahme reagieren. Dies hat vermutlich auch Auswirkungen auf die PGE<sub>2</sub>-Bildung nach hyperosmolarem Schock. Die vorliegenden Ergebnisse liefern also eine schlüssige Erklärung für die geringere Annexin-Bindung. Um weiterhin zu untersuchen, ob auch die PGE<sub>2</sub>-Wirkung von außen eine schwächere Wirkung auf die fetalen Erythrozyten besitzt, wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> inkubiert. Hier zeigte sich eine geringere Annexin-Bindung der fetalen Zellen. Sie bilden also nicht nur selbst weniger PGE<sub>2</sub>, sondern sind auch etwas weniger empfindlich für PGE<sub>2</sub>, das von außen auf die Zellen einwirkt. Dies unterstreicht das vorherige Ergebnis. Um nun den nächsten Schritt im Signalweg zu überprüfen, wurde die Aktivität der unselektiven Kationenkanäle mittels der patch-clamp-Methode untersucht. Und in der Tat zeigt sich eine signifikant geringere Leitfähigkeit der unselektiven Kationenkanäle bei den fetalen Erythrozyten. Der durch diese Kanäle vermittelte Einstrom von Kationen ist unselektiv für die Valenz und wird durch intrazelluläres Chlorid und die Zellgröße reguliert [Huber et al., 2001; Durantou et al., 2002; Lang et al., 2003c]. Bei den fetalen Erythrozyten wurde nun auch eine geringere unstimulierte Aktivität der Kanäle gefunden. Der Schluss liegt nahe, dass diese Zellen entweder weniger Kanäle exprimieren oder die vorhandenen Kanäle inaktiv und weniger aktivierbar sind. In jedem Fall resultiert ein geringer Einstrom von Kationen. Dabei hat der Calcium-Einstrom die größte Bedeutung für die Eryptose [Boas et al., 1998; Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Lang et al., 2002]. Ein intrazellulärer Calcium-Anstieg lässt sich durch Färbung mit Fluo-3/AM nachweisen. Dabei zeigte sich ein signifikant geringerer Calcium-Anstieg in fetalen Erythrozyten nach Chloridwegnahme. Die geringere Aktivität der Kationenkanäle resultiert also in der Tat in einem geringeren Calcium-Einstrom. Somit ergibt sich ein schlüssiges Bild der Vorgänge, da die Scramblase bei den fetalen Erythrozyten unter diesen Bedingungen nicht durch Calcium-Einstrom aktiviert wird.

#### **4.2.5 PAF und Ceramid-Signalweg**

Hyperosmolarer Schock aktiviert nicht nur PGE<sub>2</sub>-Bildung, sondern über die Freisetzung von PAF ebenfalls einen zweiten Signalweg über Ceramid, der zur Phosphatidylserin-Exposition führt [Lang et al., 2004a; Lang et al., 2006b]. Es liegt also nahe zu vermuten, dass fetale Zellen in diesem Zusammenhang Unterschiede gegenüber den adulten Zellen zeigen. Um dies zu untersuchen, wurden fetale Erythrozyten im Vergleich zu adulten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von PAF inkubiert. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Annexin-Bindung. Darüber hinaus zeigte sich eine niedrigere spontane Ceramid-Formation der fetalen Zellen. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht signifikant. Es lässt somit keine zwingenden Schlüsse zu, gibt jedoch einen Hinweis. In Verbindung mit den Ergebnissen bezüglich des PAF und des hyperosmolaren Schocks erscheint der Schluss gerechtfertigt, dass die fetalen Zellen auch diesen zweiten Signalweg in geringerer Weise aktivieren. Da PAF eine relevante Rolle in der Hämostase spielt und die verstärkte Phosphatidylserin-Exposition zur Adhäsion an das Endothel [Closse et al., 1999] und an andere Zellen [Eda und Sherman, 2002] beiträgt, ist auch eine Bedeutung für die Hämostase denkbar, die im fetalen Kreislauf möglicherweise unerwünscht ist.

#### **4.3 Schlussfolgerung**

Entsprechend der Zielsetzung geben die Ergebnisse Aufschluss über das Verhalten der fetalen Erythrozyten gegenüber verschiedenen Auslösern der Eryptose und ermöglichen so ein Verständnis der Vorgänge des Eryptose-Verhaltens dieser Erythrozytenpopulation.

Ein Teil der Ergebnisse scheint überraschend. Wie passt es zusammen, dass fetale Erythrozyten eine kürzere Lebensdauer aufweisen [Pearson, 1967] und zugleich resistenter sind gegenüber einer Reihe bekannter Eryptose-Stimuli? Wie eingangs ausgeführt, unterscheiden sich die Mechanismen, welche die Lebensspanne eines Erythrozyten determinieren, von jenen, die den programmierten Zelltod auslösen. Das heißt, dass diese Ergebnisse unter Umständen

keine konkrete Bedeutung für die maximale Lebensspanne des fetalen Erythrozyten haben, sondern vielmehr die Wahrscheinlichkeit beeinflussen, diese maximale Lebensspanne überhaupt zu erreichen. Fetale Zellen weisen vermehrt Charakteristika der Senescence auf [Matovcik et al., 1986; Lane et al., 1988]. Dies könnte für ihre im Vergleich zu adulten Erythrozyten kürzere Maximallebensdauer verantwortlich sein. Gelangen fetale Zellen in den mütterlichen Kreislauf, weisen sie eine höhere Lebenszeit auf [Sebring und Polesky, 1990; Dziegiel et al., 2005]. Auch kernhaltige Vorläuferzellen, die in den mütterlichen Kreislauf gelangen, zeigen keine Phosphatidylserin-Exposition [Hristoskova et al., 2003]. Umgekehrt sterben transfundierte adulte Zellen im Fetus schneller als im Körper Erwachsener [Jones et al., 1986]. Es ist also denkbar, dass der fetale Organismus Stressoren bereithält, die eine geringere Eryptose-Neigung in manchen Bereichen erfordern.

Mit der Geburt kehren sich die Verhältnisse abrupt um. Das fetale Blut muss in der Lage sein unter enorm sauerstoffarmen Bedingungen ausreichend Sauerstoff zu transportieren. Dies gelingt durch einen sehr hohen Hb-Wert und die große Sauerstoff-Affinität. Nach der Geburt resultiert durch die plötzliche Sauerstoff-Atmung eine viel zu große Sauerstoff-Affinität und ein zu hoher Hb-Wert. Dies führt zu einem starkem oxidativen Stress. Und nun haben die fetalen Erythrozyten entsprechend den vorliegenden Ergebnissen eine sehr große Wahrscheinlichkeit in die Eryptose zu gehen, während reifere Zellen weniger gefährdet sind. Letztlich erfolgt die Umstellung auf adulte Zellen sehr schnell [Matoth et al., 1971]. Eryptose ist folglich möglicherweise einer der maßgeblichen Faktoren der Trimenonreduktion und der Umstellung nach der Geburt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben eventuell auch Bedeutung für kindliche Anämie-Formen, vor allem bei Frühgeborenen. Die Anämie des Frühgeborenen wird bislang insbesondere auf Blutabnahmen und eine unzureichende Epo-Produktion zurückgeführt [Strauss, 1994]. Da die vorliegenden Ergebnisse bei fetalen Erythrozyten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress zeigen, erscheint es sinnvoll anzunehmen, dass bei Frühgeborenen auch vermehrte Eryptose zur Frühgeborenenanämie beiträgt. Die Umstellung auf

adultes Hämoglobin hängt primär vom Gestationsalter ab [Bard, 1973]. Dies bedeutet, dass beim Frühgeborenen eine vermehrte Eryptose durch oxidativen Stress ausgelöst werden dürfte, die nicht rechtzeitig durch die bei reif geborenen Kindern ablaufende Anpassung kompensiert wird. Die vorliegenden Ergebnisse liefern also einen weiteren denkbaren Erklärungsansatz für dieses Krankheitsbild, der langfristig auch therapeutische Möglichkeiten eröffnen könnte. Dies ist umso mehr bedeutsam dadurch, dass Epo dieses Krankheitsbild vor allem in der Frühphase nicht ganz zufriedenstellend therapiert und Transfusionen häufig nicht vermieden werden können [Strauss, 2006].

## 5 Zusammenfassung

Eryptose stellt die besondere Form der Apoptose der Erythrozyten dar, die wie die Apoptose kernhaltiger Zellen zu Phosphatidylserin-Exposition und Zellschrumpfung führt. Über durchflusszytometrische Untersuchung der Bindung FITC-markierten Annexins und des forward scatters kann dies nachgewiesen werden. Die Eryptose lässt sich *in vitro* durch die Entfernung von Chlorid oder Glucose aus dem Medium sowie durch Hyperosmolarität und oxidativen Stress auslösen. Hyperosmolarität und Chloridwegnahme führen durch PGE<sub>2</sub>-Bildung zur Öffnung unselektiver Kationenkanäle, was einen Calcium-Einstrom in die Zelle verursacht. Die für die Phosphatidylserin-Exposition verantwortliche Scramblase wird durch den Calcium-Einstrom aktiviert. Die Leitfähigkeit der am Ca<sup>2+</sup>-Einstrom beteiligten Kanäle kann mittels patch-clamp untersucht werden, der Calcium-Einstrom selbst wird durch Färbung mit Ca<sup>2+</sup>-sensitivem Fluo-3/AM nachgewiesen. Die unselektiven Kationenkanäle reagieren weiterhin auf oxidativen Stress (hier ausgelöst durch Zugabe von tert-Butylhydroperoxid). Hyperosmolarer Schock führt zusätzlich über PAF-Freisetzung zu Ceramid-Bildung, was die Scramblase für Calcium sensitiviert.

Fetale Erythrozyten unterscheiden sich deutlich von adulten Zellen und diese besondere Erythrozytenpopulation wird bald nach der Geburt aus der Blutbahn entfernt.

Diese Arbeit setzte sich zum Ziel, die Eryptose fetaler Erythrozyten zu untersuchen.

Dabei zeigte sich eine geringere Empfindlichkeit der fetalen Zellen gegenüber Hyperosmolarität und Chloridwegnahme. Dementsprechend wurde eine geringere Bildung sowie Empfindlichkeit gegenüber PGE<sub>2</sub> nachgewiesen. Weiterhin konnten die vermutlich daraus resultierende geringere Kationenkanal-Leitfähigkeit und der dadurch abgeschwächte Calcium-Anstieg in der Zelle beobachtet werden. Darüber hinaus wurde auch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber PAF festgestellt. Schließlich wurde etwas weniger spontane Ceramid-Bildung beobachtet. Andererseits sind fetale Erythrozyten empfindlicher gegenüber Glucose-Depletion und oxidativem Stress, was auch im

forward scatter zu stärkerer Zellschrumpfung führt. Fetale Erythrozyten zeigen somit wie adulte Zellen Eryptose, wobei je nach Stimulus eine geringere oder höhere Resistenz beobachtet wurde. Diese Ergebnisse liefern einen möglichen Erklärungsansatz für die Trimenonreduktion und die Anämie des Frühgeborenen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akel, A., Hermle, T., Niemoeller, O. M., Kempe, D. S., Lang, P. A., Attanasio, P., Podolski, M., Wieder, T., und Lang, F.: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine. *Eur J Pharmacol* 532 1-2 **2006**: S. 11-17
- Alter, B. P., Goldberg, J. D., und Berkowitz, R. L.: Red cell size heterogeneity during ontogeny. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 10 4 **1988**: S. 279-282
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., und Willems, G. M.: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J.Biol.Chem.* 265 9 **25-3-1990**: S. 4923-4928
- Andrews, D. A. und Low, P. S.: Role of red blood cells in thrombosis. *Curr.Opin.Hematol.* 6 2 **1999**: S. 76-82
- Andrews, D. A., Yang, L., und Low, P. S.: Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood* 100 9 **1-11-2002**: S. 3392-3399
- Antonini, E., Ioppolo, C., Giardina, B., und Brunori, M.: Chemical modifications of SH groups intraerythrocytic hemoglobin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 74 4 **21-2-1977**: S. 1647-1655
- Armato, U., Romano, F., Andreis, P. G., Paccagnella, L., und Marchesini, C.: Growth stimulation and apoptosis induced in cultures of neonatal rat liver cells by repeated exposures to epidermal growth factor/urogastrone with or without associated pancreatic hormones. *Cell Tissue Res* 245 3 **1986**: S. 471-480
- Armstrong, D. H., Schroeder, W. A., und Fenninger, W. D.: A comparison of the percentage of fetal hemoglobin in human umbilical cord blood as determined by chromatography and by alkali denaturation. *Blood* 22 **1963**: S. 554-565
- Ballen, K. K.: New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood* 105 10 **15-5-2005**: S. 3786-3792
- Bank, A.: Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood* 107 2 **2006**: S. 435-443
- Bard, H.: Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J.Clin.Invest* 52 8 **1973**: S. 1789-1795

- Bard, H. und Widness, J. A.: Effect of recombinant human erythropoietin on the switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis in preterm infants. *J.Pediatr.* 127 3 **1995**: S. 478-480
- Barry, P. H. und Lynch, J. W.: Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J.Membr.Biol.* 121 2 **1991**: S. 101-117
- Bauer, C., Ludwig, I., und Ludwig, M.: Different effects of 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate on the oxygen affinity of adult and foetal human haemoglobin. *Life Sci* 7 **1968**: S. 1336-1343
- Bautista, M. L., Altaf, W., Lall, R., und Wapnir, R. A.: Cord blood red cell osmotic fragility: a comparison between preterm and full-term newborn infants. *Early Hum.Dev.* 72 1 **2003**: S. 37-46
- Berg, C. P., Engels, I. H., Rothbart, A., Lauber, K., Renz, A., Schlosser, S. F., Schulze-Osthoff, K., und Wesselborg, S.: Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 8 12 **2001**: S. 1197-1206
- Bieberich, E., MacKinnon, S., Silva, J., Noggle, S., und Condie, B. G.: Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. *J.Cell Biol.* 162 3 **4-8-2003**: S. 469-479
- Bilmen, S., Aksu, T. A., Gumuslu, S., Korgun, D. K., und Canatan, D.: Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin.Chim.Acta* 303 1-2 **2001**: S. 83-86
- 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., und Lang, F.: Enhanced susceptibility to erythrocyte "apoptosis" following phosphate depletion. *Pflugers Arch* 448 5 **2004**: S. 471-477
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Merriam, J. E., March, C. J., und Hopp, T. P.: A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J.Biol.Chem.* 264 10 **5-4-1989**: S. 5323-5326
- Boas, F. E., Forman, L., und Beutler, E.: Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 6 **1998**: S. 3077-3081
- Bookchin, R. M., Ortiz, O. E., und Lew, V. L.: Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog.Clin.Biol.Res.* 240 **1987**: S. 193-200

- Bosman, G. J., Willekens, F. L., und Werre, J. M.: Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem.* 16 1-3 **2005**: S. 1-8
- Bossi, D. und Giardina, B.: Red cell physiology. *Mol.Aspects Med.* 17 2 **1996**: S. 117-128
- Bracci, R., Perrone, S., und Buonocore, G.: Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatr.Suppl* 91 438 **2002**: S. 130-134
- Brand, V. B., Sandu, C. D., Duranton, C., Tanneur, V., Lang, K. S., Huber, S. M., und Lang, F.: Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem.* 13 6 **2003**: S. 347-356
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J. P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J. J., Montreuil, J., und Ameisen, J. C.: Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death.Differ.* 8 12 **2001**: S. 1143-1156
- Buhimschi, I. A., Buhimschi, C. S., Pupkin, M., und Weiner, C. P.: Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 189 1 **2003**: S. 181-188
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van, Ness K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., und .: Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256 5053 **3-4-1992**: S. 97-100
- Clarke, P. G. und Clarke, S.: Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193 2 **1996**: S. 81-99
- Closse, C., chary-Prigent, J., und Boisseau, M. R.: Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br.J.Haematol.* 107 2 **1999**: S. 300-302
- Colin, F. C., Gallois, Y., Rapin, D., Meskar, A., Chabaud, J. J., Vicariot, M., und Menez, J. F.: Impaired fetal erythrocytes' filterability: relationship with cell size, membrane fluidity, and membrane lipid composition. *Blood* 79 8 **15-4-1992**: S. 2148-2153
- Conti, A. A., Lippi, D., und Gensini, G. F.: The historical evolution of the concept of apoptosis in rheumatic diseases. *Reumatismo* 57 1 **2005**: S. 57-61

- Coulombel, L., Dehan, M., Tchernia, G., Hill, C., und Vial, M.: The number of polymorphonuclear leukocytes in relation to gestational age in the newborn. *Acta Paediatr.Scand.* 68 5 **1979**: S. 709-711
- Crowley, J., Ways, P., und Jones, J. W.: Human fetal erythrocyte and plasma lipids. *J.Clin.Invest* 44 **1965**: S. 989-998
- Curtin, J. F. und Cotter, T. G.: Apoptosis: Historical perspectives. *Essays Biochem* 39 **2003**: S. 1-10
- Dame, C., Fahnenstich, H., Freitag, P., Hofmann, D., bdul-Nour, T., Bartmann, P., und Fandrey, J.: Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 92 9 **1-11-1998**: S. 3218-3225
- Damonte, G., Guida, L., Sdraffa, A., Benatti, U., Melloni, E., Forteleoni, G., Meloni, T., Carafoli, E., und De, Flora A.: Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium* 13 10 **1992**: S. 649-658
- Danon, Y., Kleimann, A., und Danon, D.: The osmotic fragility and density distribution of erythrocytes in the newborn. *Acta Haematol.* 43 4 **1970**: S. 242-247
- Daugas, E., Cande, C., und Kroemer, G.: Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death.Differ.* 8 12 **2001**: S. 1131-1133
- Dekkers, D. W., Comfurius, P., Bevers, E. M., und Zwaal, R. F.: Comparison between Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem.J.* 362 Pt 3 **15-3-2002**: S. 741-747
- Durantou, C., Huber, S. M., und Lang, F.: Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J.Physiol* 539 Pt 3 **15-3-2002**: S. 847-855
- Durantou, C., Huber, S. M., Tanneur, V., Brand, V. B., Akkaya, C., Shumilina, E. V., Sandu, C. D., und Lang, F.: Organic osmolyte permeabilities of the malaria-induced anion conductances in human erythrocytes. *J.Gen.Physiol* 123 4 **2004**: S. 417-426
- Dziegiel, M. H., Koldkjaer, O., und Berkowicz, A.: Massive antenatal fetomaternal hemorrhage: evidence for long-term survival of fetal red blood cells. *Transfusion* 45 4 **2005**: S. 539-544
- Eda, S. und Sherman, I. W.: Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem.* 12 5-6 **2002**: S. 373-384

- Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W. J., Liu, W. M., Cramer, M. J., Lips, D. J., und Doevendans, P. A.: Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc.Res.* 61 3 **15-2-2004**: S. 414-426
- Egberts, J. und Van Pelt, J.: Evaluation of the blood analyzer ABL 735 radiometer for determination of the percentage of fetal hemoglobin in fetal and neonatal blood. *Scand J Clin Lab Invest* 64 2 **2004**: S. 128-131
- Eisele, K., Lang, P. A., Kempe, D. S., Klarl, B. A., Niemoller, O., Wieder, T., Huber, S. M., Duranton, C., und Lang, F.: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol* 210 1-2 **2006**: S. 116-122
- Ellis, H. M. und Horvitz, H. R.: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44 6 **1986**: S. 817-829
- Fadeel, B.: Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance. *Antioxid.Redox.Signal.* 6 2 **2004**: S. 269-275
- Fadeel, B. und Orrenius, S.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J.Intern.Med.* 258 6 **2005**: S. 479-517
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., und Henson, P. M.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148 7 **1992**: S. 2207-2216
- Forestier, F., Daffos, F., Galacteros, F., Bardakjian, J., Rainaut, M., und Beuzard, Y.: Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr.Res.* 20 4 **1986**: S. 342-346
- Frago, L. M., Leon, Y., de la Rosa, E. J., Gomez-Munoz, A., und Varela-Nieto, I.: Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J.Cell Sci.* 111 ( Pt 5) **1998**: S. 549-556
- Gahr, M.: Different biochemical properties of foetal and adult red cell hexokinase isoenzymes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361 6 **1980**: S. 829-837
- Gallagher, P. G., Chang, S. H., Rettig, M. P., Neely, J. E., Hillery, C. A., Smith, B. D., und Low, P. S.: Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis. *Blood* 101 11 **1-6-2003**: S. 4625-4627
- Gerner, C., Gotzmann, J., Frohwein, U., Schamberger, C., Ellinger, A., und Sauermann, G.: Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell Death.Differ.* 9 6 **2002**: S. 671-681

- Giardina, B., Scatena, R., Clementi, M. E., Cerroni, L., Nuutinen, M., Brix, O., Sletten, S. N., Castagnola, M., und Condo, S. G.: Physiological relevance of the overall delta H of oxygen binding to fetal human hemoglobin. *J.Mol.Biol.* 229 2 **20-1-1993**: S. 512-516
- Gibson, J. S., Speake, P. F., Muzyamba, M. C., Husain, F., Luckas, M. C., und Ellory, J. C.: K(+) transport in red blood cells from human umbilical cord. *Biochim Biophys Acta* 1512 2 **2001**: S. 231-238
- Glucksmann, A.: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Phil Soc* 26 **1951**: S. 59-86
- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., und Chan, C.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J.Cell Sci.* 111 ( Pt 21) **1998**: S. 3209-3220
- Grassme, H., Bock, J., Kun, J., und Gulbins, E.: Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J.Biol.Chem.* 277 33 **16-8-2002**: S. 30289-30299
- Green, D. R. und Reed, J. C.: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 5381 **1998**: S. 1309-1312
- Guajardo, L., Beharry, K. D., Modanlou, H. D., und Aranda, J. V.: Ascorbic acid concentrations in umbilical cord veins and arteries of preterm and term newborns. *Biol.Neonate* 68 1 **1995**: S. 1-9
- Halvorsen, S. und Finne, P. H.: Erythropoietin production in the human fetus and newborn. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 149 1 **29-3-1968**: S. 576-577
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391 2 **1981**: S. 85-100
- He, Z. und Russell, J. E.: Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 (zeta(2)epsilon(2)), Gower-2 (alpha(2)epsilon(2)), and Portland-2 (zeta(2)beta(2)) assembled in complex transgenic-knockout mice. *Blood* 97 4 **2001**: S. 1099-1105
- Head, D. J., Lee, Z. E., Poole, J., und Avent, N. D.: Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *Br.J.Haematol.* 129 1 **2005a**: S. 130-137
- Head, D. J., Lee, Z. E., Swallah, M. M., und Avent, N. D.: Ligation of CD47 mediates phosphatidylserine expression on erythrocytes and a

- concomitant loss of viability in vitro. *Br.J.Haematol.* 130 5 **2005b**: S. 788-790
- Hoffman, J. F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., und Wickrema, A.: The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 12 **10-6-2003**: S. 7366-7371
- Hristoskova, S., Holzgreve, W., und Hahn, S.: Fetal nucleated erythrocytes in maternal circulation do not display a classic membrane-associated apoptotic characteristic (phosphatidylserine exposure) despite being positive by terminal dUTP nuclear end labeling. *Clin.Chem.* 49 11 **2003**: S. 1934-1937
- Huber, S. M., Gamper, N., und Lang, F.: Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch.* 441 4 **2001**: S. 551-558
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., und Krupitza, G.: The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutat Res* 543 3 **2003**: S. 235-249
- Jacobson, M. D., Weil, M., und Raff, M. C.: Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 3 **1997**: S. 347-354
- Jain, S. K.: Presence of phosphatidylserine in the outer membrane bilayer of newborn human erythrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 136 3 **14-5-1986**: S. 914-920
- Jain, S. K.: The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Semin Hematol* 26 4 **1989**: S. 286-300
- Jain, S. K., Wise, R., und Bocchini, J. J., Jr.: Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers. *J.Am.Coll.Nutr.* 15 1 **1996**: S. 44-48
- Jones, H. M., Linch, D. C., Nicolaidis, K., und Rodeck, C. H.: Survival of transfused adult cells in the fetus. *Fetal Ther.* 1 4 **1986**: S. 193-195
- Kaestner, L. und Bernhardt, I.: Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry.* 55 1-2 **2002**: S. 71-74
- Kempe, D. S., Lang, P. A., Durantou, C., Akel, A., Lang, K. S., Huber, S. M., Wieder, T., und Lang, F.: Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *Faseb J* 20 2 **2006**: S. 368-370

- Kempe, D. S., Lang, P. A., Eisele, K., Klarl, B. A., Wieder, T., Huber, S. M., Duranton, C., und Lang, F.: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol* 288 2 **2005**: S. C396-C402
- Kerr, J. F.: History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182 **2002**: S. 471-474
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., und Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 4 **1972**: S. 239-257
- Kiefer, C. R. und Snyder, L. M.: Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr.Opin.Hematol.* 7 2 **2000**: S. 113-116
- Kiserud, T.: Physiology of the fetal circulation. *Semin Fetal Neonatal Med* 10 6 **2005**: S. 493-503
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., Eisele, K., Podolski, M., Huber, S. M., Wieder, T., und Lang, F.: Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 290 1 **2006**: S. C244-C253
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., und van Oers, M. H.: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 5 **1-9-1994**: S. 1415-1420
- Krammer, P. H.: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 6805 **12-10-2000**: S. 789-795
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., und Moestrup, S. K.: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409 6817 **11-1-2001**: S. 198-201
- Kroemer, G., Dallaporta, B., und Resche-Rigon, M.: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60 **1998**: S. 619-642
- Kuypers, F. A. und de Jong K.: The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 50 2 **2004**: S. 147-158
- Lakshmi, C., Deb, C., Ray, C., und Ray, M. R.: Reduction of hematotoxicity and augmentation of antitumor efficacy of cyclophosphamide by dopamine. *Neoplasma* 52 1 **2005**: S. 68-73

- Lane, P. A., Galili, U., Iarocci, T. A., Shew, R. L., und Mentzer, W. C.: Cellular dehydration and immunoglobulin binding in senescent neonatal erythrocytes. *Pediatr.Res.* 23 3 **1988**: S. 288-292
- Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., und Wieder, T.: Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 187 1-2 **2006b**: S. 191-198
- Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., und Wieder, T.: Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid.Redox.Signal.* 8 7-8 **2006a**: S. 1183-1192
- Lang, F., Lang, K. S., Wieder, T., Myssina, S., Birka, C., Lang, P. A., Kaiser, S., Kempe, D., Duranton, C., und Huber, S. M.: Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflugers Arch* 447 2 **2003a**: S. 121-125
- Lang, F., Shumilina, E., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A., und Huber, S. M.: Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib.Nephrol.* 152 **2006c**: S. 142-160
- Lang, F., Uhlemann, A. C., Lepple-Wienhues, A., Szabo, I., Siemen, D., Nilius, B., und Gulbins, E.: Cell volume regulatory mechanisms in apoptotic cell death. *Herz* 24 3 **1999**: S. 232-235
- Lang, K. S., Duranton, C., Poehlmann, H., Myssina, S., Bauer, C., Lang, F., Wieder, T., und Huber, S. M.: Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 10 2 **2003b**: S. 249-256
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M., und Lang, F.: Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 15 5 **2005a**: S. 195-202
- Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., Huber, S. M., Lang, F., und Wieder, T.: Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death.Differ.* 11 2 **2004a**: S. 231-243
- Lang, K. S., Myssina, S., Lang, P. A., Tanneur, V., Kempe, D. S., Mack, A. F., Huber, S. M., Wieder, T., Lang, F., und Duranton, C.: Inhibition of erythrocyte phosphatidylserine exposure by urea and Cl. *Am J Physiol Renal Physiol* 286 6 **2004b**: S. F1046-F1053
- Lang, K. S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S. M., Lang, F., und Duranton, C.: Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367 4 **2003c**: S. 391-396

- Lang, K. S., Roll, B., Myssina, S., Schittenhelm, M., Scheel-Walter, H. G., Kanz, L., Fritz, J., Lang, F., Huber, S. M., und Wieder, T.: Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 12 5-6 **2002**: S. 365-372
- Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., Hermle, T., Attanasio, P., Akel, A., Schafer, R., Friedrich, B., Risler, T., Baur, M., Olbricht, C. J., Zimmerhackl, L. B., Zipfel, P. F., Wieder, T., und Lang, F.: Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J Mol Med* 84 5 **2006d**: S. 378-388
- Lang, P. A., Huober, J., Bachmann, C., Kempe, D. S., Sobiesiak, M., Akel, A., Niemoeller, O. M., Dreischer, P., Eisele, K., Klarl, B. A., Gulbins, E., Lang, F., und Wieder, T.: Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*. 18 1-3 **2006e**: S. 151-164
- Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Birka, C., Weinstock, C., Northoff, H., Wieder, T., Lang, F., und Huber, S. M.: Effect of *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin on human erythrocytes. *Cell Microbiol* 6 4 **2004c**: S. 391-400
- Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., und Huber, S. M.: Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 285 6 **2003e**: S. C1553-C1560
- Lang, P. A., Kaiser, S., Myssina, S., Wieder, T., Lang, F., und Huber, S. M.: Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 285 6 **2003d**: S. C1553-C1560
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., Hermle, T., Niemoeller, O. M., Attanasio, P., Huber, S. M., Wieder, T., Lang, F., und Duranton, C.: Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372 3 **2005b**: S. 228-235
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder, T., und Huber, S. M.: PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 12 5 **2005c**: S. 415-428
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Tanneur, V., Eisele, K., Klarl, B. A., Myssina, S., Jendrossek, V., Ishii, S., Shimizu, T., Waidmann, M., Hessler, G., Huber, S. M., Lang, F., und Wieder, T.: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 118 Pt 6 **2005d**: S. 1233-1243
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., und Lazebnik, Y.: Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297 5585 **23-8-2002**: S. 1352-1354
- Lee, J. M. und Bernstein, A.: Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev.* 14 2 **1995**: S. 149-161

- Leist, M. und Jaattela, M.: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2 8 **2001**: S. 589-598
- Linderkamp, O., Friederichs, E., und Meiselman, H. J.: Mechanical and geometrical properties of density-separated neonatal and adult erythrocytes. *Pediatr.Res.* 34 5 **1993**: S. 688-693
- Liu, G., Wu, C., Wu, Y., und Zhao, Y.: Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol* 64 1 **2006**: S. 1-9
- Lockshin, R. A. und Williams, C. M.: Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11 **1965**: S. 123-133
- Lutz, H. U.: Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 50 2 **2004**: S. 107-116
- Mandal, D., Baudin-Creuzat, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M., und Basu, J.: Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J.Biol.Chem.* 278 52 **26-12-2003**: S. 52551-52558
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., und Basu, J.: Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 280 47 **2005**: S. 39460-39467
- Mandal, D., Moitra, P. K., Saha, S., und Basu, J.: Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett.* 513 2-3 **27-2-2002**: S. 184-188
- Matarrese, P., Straface, E., Pietraforte, D., Gambardella, L., Vona, R., Maccaglia, A., Minetti, M., und Malorni, W.: Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J.* 19 3 **2005**: S. 416-418
- Matoth, Y., Zaizov, R., und Varsano, I.: Postnatal changes in some red cell parameters. *Acta Paediatr.Scand.* 60 3 **1971**: S. 317-323
- Matovcik, L. M., Chiu, D., Lubin, B., Mentzer, W. C., Lane, P. A., Mohandas, N., und Schrier, S. L.: The aging process of human neonatal erythrocytes. *Pediatr.Res.* 20 11 **1986**: S. 1091-1096
- Mavelli, I., Ciriolo, M. R., Rossi, L., Meloni, T., Forteleoni, G., De, Flora A., Benatti, U., Morelli, A., und Rotilio, G.: Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur.J.Biochem.* 139 1 **15-2-1984**: S. 13-18

- McGrath, K. E. und Palis, J.: Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp.Hematol.* 33 9 **2005**: S. 1021-1028
- Melino, G., Knight, R. A., und Green, D. R.: Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ* 8 1 **2001**: S. 1-3
- Mercer, J. S. und Skovgaard, R. L.: Neonatal transitional physiology: a new paradigm. *J.Perinat.Neonatal Nurs.* 15 4 **2002**: S. 56-75
- Messmer, U. K. und Pfeilschifter, J.: New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays* 22 10 **2000**: S. 878-881
- Metaxotou-Mavromati, A. D., Antonopoulou, H. K., Laskari, S. S., Tsiarta, H. K., Ladis, V. A., und Kattamis, C. A.: Developmental changes in hemoglobin F levels during the first two years of life in normal and heterozygous beta-thalassemia infants. *Pediatrics* 69 6 **1982**: S. 734-738
- Minta, A., Kao, J. P., und Tsiens, R. Y.: Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J.Biol.Chem.* 264 14 **15-5-1989**: S. 8171-8178
- Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M., Oiki, E., Kambayashi, J., und Monden, M.: Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 110 6 **1996**: S. 1897-1904
- Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A., Lang, K. S., Friedrich, B., Risler, T., Wieder, T., und Lang, F.: Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J.Am.Soc.Nephrol.* 14 11 **2003**: S. 2750-2757
- Nhan, T. Q., Liles, W. C., und Schwartz, S. M.: Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am.J.Pathol.* 169 3 **2006**: S. 729-737
- Niemoeller, O. M., Akel, A., Lang, P. A., Attanasio, P., Kempe, D. S., Hermle, T., Sobiesiak, M., Wieder, T., und Lang, F.: Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 374 1 **2006a**: S. 41-49
- Niemoeller, O. M., Kiedaisch, V., Dreischer, P., Wieder, T., und Lang, F.: Stimulation of eryptosis by aluminium ions. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **6-9-2006b**: S.
- Orrenius, S.: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol.Lett.* 149 1-3 **1-4-2004**: S. 19-23
- Oski, F. A.: Red cell metabolism in the newborn infant. V. Glycolytic intermediates and glycolytic enzymes. *Pediatrics* 44 1 **1969**: S. 84-91

- Palis, J. und Segel, G. B.: Developmental biology of erythropoiesis. *Blood Rev.* 12 2 **1998**: S. 106-114
- Pant, H. C., Virmani, M., und Gallant, P. E.: Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 117 2 **16-12-1983**: S. 372-377
- Papucci, Laura, Formigli, Lucia, Schiavone, Nicola, Tani, Alessia, Donnini, Martino, Lapucci, Andrea, Perna, Federico, Tempestini, Alessio, Witort, Ewa, Morganti, Maria, Nosi, Daniele, Orlandini, GiovanniE, Zecchi Orlandini, Sandra, und Capaccioli, Sergio: Apoptosis shifts to necrosis via intermediate types of cell death by a mechanism depending on c-myc and bcl-2 expression. *Cell and Tissue Research* 316 2 **2004**: S. 197-209
- Pearson, H. A.: Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 70 2 **1967**: S. 166-171
- Perutz, M. F.: Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect.* 63 **1969**: S. 213-261
- Peschle, C., Mavilio, F., Care, A., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Salvo, G., Samoggia, P., Petti, S., Guerriero, R., und Marinucci, M.: Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of zeta---alpha and epsilon---gamma-globin switches in primitive and definite erythropoietic lineage. *Nature* 313 5999 **1985**: S. 235-238
- Peschle, C., Migliaccio, G., Lazzaro, D., Petti, S., Mancini, G., Care, A., Russo, G., Mastroberardino, G., Migliaccio, A. R., und Testa, U.: Hemopoietic development in human embryos. *Blood Cells* 10 2-3 **1984**: S. 427-441
- Polenakovic, M. und Sikole, A.: Is erythropoietin a survival factor for red blood cells? *J.Am.Soc.Nephrol.* 7 8 **1996**: S. 1178-1182
- Raijmakers, M. T., Roes, E. M., Steegers, E. A., van der, Wildt B., und Peters, W. H.: Umbilical glutathione levels are higher after vaginal birth than after cesarean section. *J.Perinat.Med.* 31 6 **2003**: S. 520-522
- Reed, J. C.: Apoptosis-based therapies. *Nat.Rev.Drug Discov.* 1 2 **2002**: S. 111-121
- Repetto, M., Reides, C., Gomez Carretero, M. L., Costa, M., Griemberg, G., und Llesuy, S.: Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin.Chim.Acta* 255 2 **29-11-1996**: S. 107-117
- Reutelingsperger, C. P., Hornstra, G., und Hemker, H. C.: Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur.J.Biochem.* 151 3 **16-9-1985**: S. 625-629

- Rice, L. und Alfrey, C. P.: The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cell Physiol Biochem.* 15 6 **2005**: S. 245-250
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S., und Orrenius, S.: Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death.Differ.* 6 6 **1999**: S. 495-496
- Saraste, A. und Pulkki, K.: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45 3 **2000**: S. 528-537
- Saunders, J. W., Jr.: Death in embryonic systems. *Science* 154 749 **1966**: S. 604-612
- Schroit, A. J., Madsen, J. W., und Tanaka, Y.: In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J.Biol.Chem.* 260 8 **25-4-1985**: S. 5131-5138
- Sebring, E. S. und Polesky, H. F.: Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion* 30 4 **1990**: S. 344-357
- Seigneuret, M. und Devaux, P. F.: ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 12 **1984**: S. 3751-3755
- Serrani, R. E., Alonso, D., und Corchs, J. L.: States of stability/lysis in human fetal and adults red blood cells. *Arch Int Physiol Biochim* 97 3 **1989**: S. 309-316
- Shahal, Y., Bauminger, E. R., Zmora, E., Katz, M., Mazor, D., Horn, S., und Meyerstein, N.: Oxidative stress in newborn erythrocytes. *Pediatr.Res.* 29 2 **1991**: S. 119-122
- Shannon, K. M., Naylor, G. S., Torkildson, J. C., Clemons, G. K., Schaffner, V., Goldman, S. L., Lewis, K., Bryant, P., und Phibbs, R.: Circulating erythroid progenitors in the anemia of prematurity. *N.Engl.J.Med.* 317 12 **17-9-1987**: S. 728-733
- Soothill, P. W., Nicolaidis, K. H., Rodeck, C. H., und Gamsu, H.: Blood gases and acid-base status of the human second-trimester fetus. *Obstet Gynecol* 68 2 **1986**: S. 173-176
- Sorimachi, H., Ishiura, S., und Suzuki, K.: Structure and physiological function of calpains. *Biochem.J.* 328 ( Pt 3) **15-12-1997**: S. 721-732
- Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., und Prescott, S. M.: Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* 40 6 **2003**: S. 643-672

- Stamatoyannopoulos, G., Veith, R., Al-Khatti, A., Fritsch, E. F., Goldwasser, E., und Papayannopoulou, T.: On the induction of fetal hemoglobin in the adult; stress erythropoiesis, cell cycle-specific drugs, and recombinant erythropoietin. *Prog.Clin.Biol.Res.* 251 **1987**: S. 443-453
- Strauss, R. G.: Controversies in the management of the anemia of prematurity using single-donor red blood cell transfusions and/or recombinant human erythropoietin. *Transfus.Med.Rev.* 20 1 **2006**: S. 34-44
- Strauss, R. G.: Erythropoietin and neonatal anemia. *N.Engl.J.Med.* 330 17 **28-4-1994**: S. 1227-1228
- Sulston, J. E.: Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 275 938 **1976**: S. 287-297
- Tavian, M. und Peault, B.: The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp.Hematol.* 33 9 **2005**: S. 1062-1069
- Thompson, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 5203 **10-3-1995**: S. 1456-1462
- Twomey, C. und McCarthy, J. V.: Pathways of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* 9 2 **2005**: S. 345-359
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., und Reutelingsperger, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184 1 **17-7-1995**: S. 39-51
- Virchow, R.:Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologischer und pathologischer Gewebelehre, **1858**
- Vogt, C.:Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), **1842**
- Wagner, C. A., Broer, A., Albers, A., Gamper, N., Lang, F., und Broer, S.: The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/LAT1 is associated in *Xenopus* oocytes with a non-selective cation channel that is regulated by the serine/threonine kinase sgk-1. *J.Physiol* 526 Pt 1 **1-7-2000**: S. 35-46
- Wassell, J.: Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin.Lab* 46 11-12 **2000**: S. 547-552
- Willekens, F. L., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., Bos, H. J., Bosman, G. J., van den Bos, A. G., Verkleij, A. J., und Werre, J. M.: Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* 101 2 **15-1-2003**: S. 747-751

- Willekens, F. L., Werre, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., van den Bos, A. G., Bosman, G. J., und van Berkel, T. J.: Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 105 5 **1-3-2005**: S. 2141-2145
- Woodcock, J.: Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB.Life* 58 8 **2006**: S. 462-466
- Woon, L. A., Holland, J. W., Kable, E. P., und Roufogalis, B. D.: Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25 4 **1999**: S. 313-320
- Yang, T., Park, J. M., Arend, L., Huang, Y., Topaloglu, R., Pasumarthy, A., Praetorius, H., Spring, K., Briggs, J. P., und Schnermann, J.: Low chloride stimulation of prostaglandin E2 release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J.Biol.Chem.* 275 48 **1-12-2000**: S. 37922-37929
- Yuan, J. und Horvitz, H. R.: The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116 2 **1992**: S. 309-320
- Zhou, Q., Zhao, J., Wiedmer, T., und Sims, P. J.: Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 99 11 **1-6-2002**: S. 4030-4038

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

<b>AE1</b>	Anion exchanger 1
<b>AIF</b>	Apoptosis inducing factor
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic protease- activating factor
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-Triphosphat
<b>Bak</b>	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer
<b>Bax</b>	Bcl- 2 associated factor
<b>Bcl- 2</b>	B- Cell- Lymphoma- 2
<b>Bid</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>CAD</b>	Caspase activated DNase
<b>Ced</b>	Caenorhabditis elegans death
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EIPA</b>	Ethylisopropylamilorid
<b>Epo</b>	Erythropoietin
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorter
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>FCS</b>	Fetal calf serum
<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
<b>IAP</b>	Inhibitory apoptosis proteins
<b>ICAD</b>	Inhibitor of CAD
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat + H <sup>+</sup>
<b>NKCC2</b>	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Cotransporter
<b>PAF</b>	Platelet activating factor

<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E2
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwerts
<b>Smac</b>	Second mitochondria-derived activator of caspases
<b>TBHP</b>	Tert- Butylhydroxiperoxid
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$

## 7.2 Publikationsverzeichnis

- Hermle, T.**, Shumilina, E., Attanasio, P., Akel, A., Kempe, D. S., Lang, P. A., Podolski, M., Gatz, S., Bachmann, R., Bachmann, C., Abele, H., Huber, S., Wieder, T., und Lang, F.: "Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes."  
*Am.J.Physiol Cell Physiol* 291 4 2006: S. C710-C717
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Akel, A., Klarl, B. A., Eisele, K., Podolski, M., **Hermle, T.**, Niemoeller, O. M., Attanasio, P., Huber, S. M., Wieder, T., Lang, F., und Duranton, C.: "Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines."  
*Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 372 3 2005: S. 228-235
- Akel, A., **Hermle, T.**, Niemoeller, O. M., Kempe, D. S., Lang, P. A., Attanasio, P., Podolski, M., Wieder, T., und Lang, F.: "Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by chlorpromazine."  
*Eur.J.Pharmacol.* 532 1-2 17-2-2006: S. 11-17
- Lang, P. A., Beringer, O., Nicolay, J. P., Amon, O., Kempe, D. S., **Hermle, T.**, Attanasio, P., Akel, A., Schafer, R., Friedrich, B., Risler, T., Baur, M., Olbricht, C. J., Zimmerhackl, L. B., Zipfel, P. F., Wieder, T., und Lang, F.: "Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome."  
*J.Mol.Med.* 84 5 2006: S. 378-388
- Niemoeller, O. M., Akel, A., Lang, P. A., Attanasio, P., Kempe, D. S., **Hermle, T.**, Sobiesiak, M., Wieder, T., und Lang, F.: "Induction of eryptosis by cyclosporine."  
*Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 374 1 2006: S. 41-49
- Kempe, D.S., Akel, A., Lang, P.A., **Hermle, T.**, Biswas, R., Muresanu J., Friedrich, B., Dreischer, P., Wolz, C., Schumacher, U., Peschel, A., Götz, A., Döring, G., Wieder, T., Gulbins, E., Lang, F.: „Suicidal erythrocyte death in sepsis.“  
*J Mol Med.* 16.12.2006 [epub ahead of print]
- Shumilina E., Kiedaisch V., Akel A., Lang P., **Hermle T.**, Kempe D., Huber S., Wieder T., Laufer S., Lang F.: "Stimulation of suicidal erythrocyte death by lipoxygenase inhibitor bay-y5884."  
*Cell Physiol Biochem.* 18 4-5 2006: S. 233-42.

### **7.3 Danksagung**

Viele Menschen haben zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen. Ihnen allen möchte ich danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in allem unterstützten und es mir ermöglichten, Medizin zu studieren.

Weiterhin möchte ich mich natürlich sehr bei Prof. Lang bedanken, der mir viele Möglichkeiten eröffnet hat. Er war ein freundlicher und engagierter Doktorvater, der immer ein offenes Ohr hatte und mir zudem Gelegenheit zu selbständiger Arbeit bot. Die Zeit im Labor war erfolgreich und ich habe viel gelernt, was auch über die konkrete Arbeit hinausging.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich zudem Frau E. Shumilina, die die patch-clamp Messungen an Erythrozyten durchgeführt hat.

Dank sagen möchte ich mich auch allen Mitgliedern des Labors. Die Arbeit mit ihnen hat viel Spass gemacht. Speziell mit Olivier Niemöller und Daniela Kempe war eine Zusammenarbeit möglich, die weit über ein rein kollegiales Verhältnis hinausreichte. Ganz besondere Erwähnung verdient weiterhin PD Thomas Wieder, der einem gerade bei technischen Fragen stets zur Seite stand und die PGE<sub>2</sub>-Messungen durchgeführt hat.

Weiterhin danke ich meinen Freunden, vor allem jenen, die mit mir durch dieses Studium gegangen sind, insbesondere Philipp Lang und Gottlieb Maier.

Meiner Freundin Anja bin ich dankbar für ihre große Unterstützung und dafür, dass sie mich in dieser Zeit begleitet hat.

## 7.4 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name: Tobias Hermle  
Geburtsdatum: 06. Oktober 1978  
Geburtsort: Oberndorf  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1985-1989 Grund- und Hauptschule Sulz a.N.  
1989-1993 Albeck-Gymnasium Sulz a.N.  
1993-1998 Droste-Hülshoff-Gymnasium Rottweil  
Juni 1998 Abitur

### **Wehrdienst:**

1998-1999 Luftwaffe, Stabsdienst

### **Hochschulstudium:**

1999-2000 Rechtswissenschaft, Universität Tübingen  
2000-2002 Medizin, Universität Tübingen  
September 2002 Physikum  
2002-2004 Medizin, Universität Mainz  
August 2003 1. Staatsexamen  
2004-2007 Medizin, Universität Tübingen  
April 2006 2. Staatsexamen  
4. Mai 2007 3. Staatsexamen

### **Doktorarbeit:**

2004-2006 Physiologisches Institut der Universität Tübingen bei Prof. Lang

### **Praktisches Jahr:**

04/06-08/06 Yale University, New Haven, USA  
08/06-12/06 University College London, GB  
12/06-03/07 Universität Tübingen